

Aus dem Fachbereich Humanmedizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Zentrum der Chirurgie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. A. Moritz  
Schwerpunkt Gefäß- und Endovascularchirurgie  
Leiter: Prof. Dr. med. Th. Schmitz-Rixen

---

**Hemmung der durch basic Fibroblast Growth Factor vermittelten  
autokrinen Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen nach  
photodynamischer Therapie von isolierter Extrazellulärmatrix**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Sebastian Gathmann  
aus Bad Berleburg

Frankfurt am Main 2003

Dekan: Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Th. Schmitz-Rixen

2. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Zanella

Tag der Promotion: 22. Juni 2004

meiner Familie



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Klinische Problematik	8
1.2	Pathophysiologie	9
1.2.1	Intimahyperplasie	9
1.2.2	Gefäßremodeling	11
1.2.3	Rolle der Extrazellulärmatrix	12
1.3	Therapeutische Strategien	13
1.3.1	Stand der Forschung	13
1.3.2	Photodynamische Therapie	14
1.4	Zielsetzung der vorliegenden Studie	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Zellkultur	19
2.1.1	Primärkulturgewinnung	19
2.1.2	Zellkultivierung	20
2.1.3	Zellcharakterisierung von EC	21
2.1.4	Zellcharakterisierung von SMC	21
2.2	Präparation der Extrazellulärmatrix	23
2.3	Photodynamische Therapie	24
2.3.1	Grundlagen	24
2.3.2	Photodynamische Therapie der Extrazellulärmatrix	25
2.4	Proliferationsassay mit 5% FCS im Kulturmedium	28
2.5	Gewinnung des Untersuchungsmaterials mit 0,5% FCS im Kulturmedium	28
2.6	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	29
2.7	Bestimmung des intrazellulären bFGF-Gehalts	30
2.8	Statistik	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Zellcharakterisierung	33
3.1.1	Zellcharakterisierung von EC	33
3.1.2	Zellcharakterisierung von SMC	35
3.2	Proliferationsassay mit 5% FCS im Kulturmedium	37
3.3	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	40
3.4	Bestimmung des intrazellulären bFGF-Gehalts	45
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	48
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Problematik	49
4.2	Photodynamische Therapie	49
4.3	Basic Fibroblast Growth Factor	51
4.4	Experimenteller Aufbau	53
4.4.1	Photosensitizer	53
4.4.2	Zellen	54

4.4.3	Extrazellulärmatrix	55
4.4.4	Versuchszeitpunkte	56
4.4.5	Proliferationsassay	56
4.4.6	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	57
4.4.7	Bestimmung des intrazellulären bFGF-Gehalts	57
4.5	Diskussion der Ergebnisse	58
4.6	Schlussfolgerung	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>Ehrenwörtliche Erlärung</b>	<b>87</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACC	Arteria carotis communis
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CASPe	Chloraluminium-sulfoniertes- Phthalocyanin
CCA	Partec Cell Counter Analyser
DADPI	fluoreszierender Farbstoff
Di-I-Ac-LDL	acetyliertes Low Density Lipoprotein, markiert mit 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3-Tetramethyl-Indocarbocyanin Perchlorat
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle's Medium
DT	Versuchsgruppe „Dark Toxicity“
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazellulärmatrix
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat Isomer I
GR	Gefäßremodeling
IH	Intimahyperplasie
HpD	Hematoporphyrinderivat
KO	Versuchsgruppe „Kontrolle“
Lee	Lamina elastica externa
Lei	Lamina elastica interna
LO	Versuchsgruppe „Light Only“
MMP	Matrix-Metalloproteinase
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDT	Photodynamische Therapie
PF	Photofrin II
PL	Versuchsgruppe „Plastik“
PS	Photosensitizer
SD	Standardabweichung
SMC	glatte Muskelzellen
TGFβ	Transforming Growth Factor-β

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Problematik

Durchblutungsstörungen mit den daraus resultierenden Schäden an Organen und Gliedmaßen führen zu einer signifikanten Morbidität und sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen (15). Diese Erkrankungen sind in den meisten Fällen durch Arteriosklerose bedingt, die zu einer Einengung oder sogar zum vollständigen Verschluss der Gefäße führt. Die Entwicklung von Möglichkeiten, arteriosklerotische Obstruktionen des arteriellen Systems zu behandeln, stellt eine wichtige Aufgabe dar.

Gegenwärtig ist ein Eingriff am Gefäßsystem die einzige Möglichkeit, bereits bestehende, arteriosklerotisch stenosierende Veränderungen zu behandeln. Zum Einsatz kommen sowohl gefäßchirurgische als auch interventionelle Techniken. Verfahren wie die Ballonangioplastie, eine Stentimplantation, die Arteriektomie oder eine Überbrückung der Stenose mittels Bypassoperation gehören zur klinischen Routine (79). Der Langzeiteffekt dieser Eingriffe wird aber durch das Auftreten einer erneuten Einengung (Restenose) stark eingeschränkt (79). Restenose ist dabei als wieder aufgetretene Einengung des Lumens um >50% des nach erfolgreicher Intervention bzw. Gefäßrekonstruktion erreichten Gefäßdurchmessers innerhalb von 6 bis 12 Monaten (56, 94) definiert. Von den etwa 400000-600000 Koronarangioplastien, die jährlich in den USA durchgeführt werden (91), kommt es bei 30-60% der Patienten zur Ausbildung von hämodynamisch signifikanten Restenosen und zum Wiederauftreten der ischämischen Symptome innerhalb eines Jahres nach anfänglich erfolgreicher Therapie (10, 91, 106). Bei Bypassoperation mittels venöser Transplantate kommt es an Koronararterien bei bis zu 25% der Patienten (79) und in der femoropoplitealen Gefäßstrombahn sogar bei bis zu 40% der Patienten (154, 168) zum Versagen der Venenbypässe schon nach 6 bis 12 Monaten.

Photodynamische Therapie (PDT), eine Behandlungsstrategie bei der durch Bestrahlung eines ansonsten biologisch inerten Farbstoffs mit Licht Radikale generiert werden, hat im Tierversuch das Auftreten von Restenosen nach vaskulären Eingriffen verhindern können (89). Ziel dieser in-vitro Studie ist es, mögliche Rückschlüsse für die Entstehung des in-vivo beobachteten positiven Remodelings nach PDT zu ziehen.



Alle Interventionen bzw. Rekonstruktionen am Gefäßsystem führen zu einer Verletzung der Gefäßwand und können gleichzeitig Ursache für das Auftreten von Restenosen sein (76). Während für akute Gefäßverschlüsse innerhalb von Stunden nach Intervention Gefäßspasmen, Thrombosen oder Gefäßdissektionen verantwortlich gemacht werden (163), werden für das Auftreten von Restenosen zwei Mechanismen diskutiert (10) : Intimahyperplasie (IH) und Gefäßremodeling (GR).

## **1.2 Pathophysiologie**

### **1.2.1 Intimahyperplasie**

Im Jahre 1906 beschrieben Carell und Guthrie erstmals IH. Sie beobachteten eine glänzende Substanz, die die Nähte einer Anastomose wenige Tage nach einer vaskulären Bypassoperation bedeckte (17). 1971 wurde dann IH erstmals als Ursache für den Verschluss von koronaren Bypassprothesen verantwortlich gemacht (64). Histopathologische Studien lassen vermuten, dass IH eine dominante Rolle bei der Ausbildung von Restenosen spielt (140). IH entsteht als Teil der Heilungsreaktion auf die Verletzung der Gefäßwand. Diese Reaktion ist sowohl im arteriellen als auch im venösen System und nach jeder Form der Verletzung zu beobachten (20, 76). Es wird angenommen, dass dieser komplexe und multifaktorielle Prozess in großem Maße durch endogene Mitogene gesteuert wird, die von adhärenenten Thrombozyten, Monozyten, Neutrophilen und verletzten Endothelzellen (EC) und glatten Muskelzellen (SMC) der Arterienwand ausgeschüttet werden (20).

Die Entstehung von IH kann sowohl anhand tierexperimenteller Untersuchungen (32) als beim Menschen (54) in drei Phasen eingeteilt werden:

Eine (1) hyperakute Phase, die in den ersten Minuten bis Stunden nach der Gefäßverletzung abläuft. Werden die Endothelzellen der Intima verletzt, kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und Neutrophilen an der luminalen Oberfläche (25, 65, 165). Zusätzlich werden die glatten Muskelzellen (SMC) der Media verletzt und dadurch aktiviert (32). Aus den geschädigten EC, SMC und Myofibroblasten werden Wachstumsfaktoren wie z.B. basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) freigesetzt (32). Darüber hinaus wird schon in den ersten Stunden die Expression der Protoonkogene c-fos, c-jun und c-myc (54) sowie der Wachstumsfaktoren Platelet-derived Growth Factor-A (PDGF-A), Transforming Growth Factor  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) und bFGF (68, 153) induziert.

In der (2) akuten Phase, die sich über mehrere Wochen erstrecken kann, findet die Organisation des gebildeten Thrombus statt, und es kommt zu einem Einwachsen von SMC in das Gefäßlumen (32). Während in unverletzten Gefäßen die Wachstumsrate der SMC, die sich in der Media befinden, bei ca. 1% liegt, erhöht sich das Wachstum der SMC im Tierexperiment bis über 20% innerhalb der ersten 48 Stunden nach Verletzung des Gefäßes (21, 69). Etwa 30% der SMC werden aktiviert, d.h. sie beginnen mit der DNA-Synthese. Sie differenzieren sich von einem kontraktilen Phänotypen, der die physiologisch funktionelle Form darstellt und u.a. für den Gefäßtonus zuständig ist, zu einem synthetisierenden Phänotypen, der sich zu teilen beginnt und ECM produziert (24). Etwa am achten Tag nach Verletzung kann man SMC auf der luminalen Seite der Lamina elastica interna (Lei) nachweisen, was darauf hinweist, dass sie durch Risse in der Lei migriert sind (22, 54, 66, 130). Die Migration der SMC ist zur Intima gerichtet, was auf die Wirkung von Faktoren wie z.B. PDGF und Matrix- Metalloproteinase (MMP) 2 und 9 hindeutet (86). Eine maximale Anzahl von SMC ist nach etwa zwei Wochen erreicht, wobei ca. 30% der SMC von der Media zur Intima ausgewandert sind (26). Gleichzeitig kommt es zu einer Infiltration von Leukozyten und zur Synthese von Wachstumsfaktoren wie bFGF und PDGF sowie Inhibitoren wie  $TGF\beta_1$  durch EC, SMC und Myofibroblasten (32). Während der ersten 72 Stunden wird die Proliferation der Zellen im wesentlichen durch bFGF vermittelt, welches von verletzten und toten Zellen freigesetzt wird. Durch bFGF-Antikörper kann 80-90% dieser Proliferation verhindert werden, wobei diese nur innerhalb der ersten 72 Stunden wirksam sind (100, 101). Etwa am siebten Tag beginnen etwa die Hälfte der in die Intima eingewanderten SMC mit einer zweiten Proliferationsphase, welche wahrscheinlich durch autokrine und parakrine Faktoren wie bFGF, PDGF und  $TGF\beta$  gesteuert wird (32).

In der anschließenden (3) chronischen Phase proliferieren die medialen SMC kontinuierlich weiter. Sie synthetisieren dabei große Mengen Extrazellulärmatrix (ECM) und lagern diese in der Intima ab (32). Gleichzeitig findet die Reendothelialisierung des Lumens statt, welche die Dauer der Proliferationsphase der SMC und damit das Ausmaß der IH beeinflusst. Im Tierexperiment konnte nämlich gezeigt werden, dass die Proliferation von SMC an den Stellen zum Stillstand kommt, die mit EC bedeckt sind (23).

### 1.2.2 Gefäßremodeling

In der Pathogenese der Restenoseentstehung spielt neben der IH auch das GR eine entscheidende Rolle (7, 56, 112). Klinische intravaskuläre Ultraschalluntersuchungen nach Koronarangioplastie zeigten, dass bei fast 60% der Patienten mit klinisch relevanten Restenosen GR verantwortlich gemacht werden kann (109, 110).

GR wird als Größenveränderung einer Arterie in einem bestimmten Zeitraum definiert. Sie wird histopathologisch als die Fläche gemessen, die von der Lamina elastica externa (Lee) umschlossen wird (139). GR berücksichtigt dabei die Beziehung zwischen arterieller Lumengröße (Lumen), der Plaque- und Mediagröße, der neointimalen Größe (IH) sowie der Veränderung des Gefäßdurchmessers. Sie stehen in folgender Beziehung zueinander (139):

$$\text{Fläche}_{\text{Lee}} = \text{Fläche}_{\text{Plaque + Media}} + \text{Fläche}_{\text{IH}} + \text{Fläche}_{\text{Lumen}}$$

Da die Flächen von Plaque und Media nahezu konstant bleiben und GR als Veränderung der Fläche<sub>Lee</sub> definiert ist, folgt:

$$\text{Gefäßremodeling} = \text{Lumenveränderung} - \text{Fläche}_{\text{IH}}$$

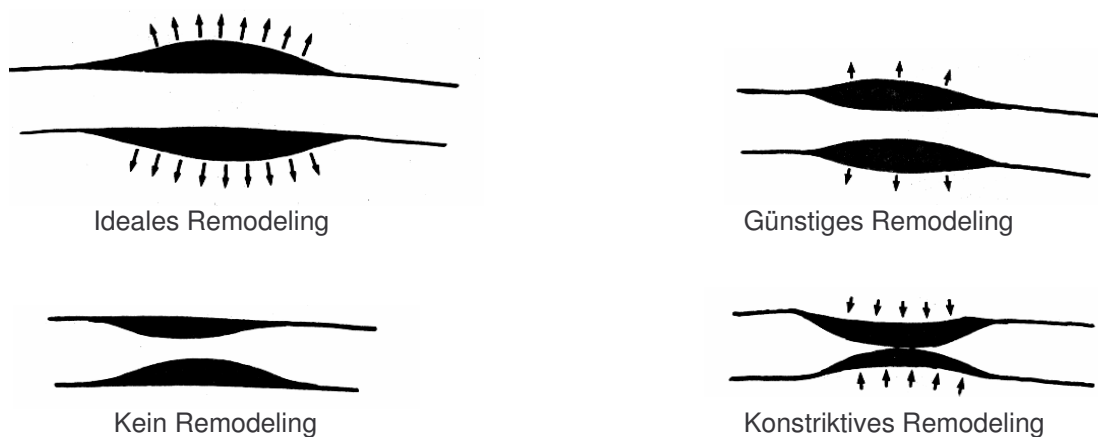
Im Rahmen der GR können die Arterien ihren Gefäßdurchmesser sowohl vergrößern als auch verkleinern. Deshalb wird das Gefäßremodeling in ideales Remodeling, günstiges Remodeling, kein Remodeling und konstriktives Remodeling unterteilt (Abb. 1.1) (139).

Unter idealem Remodeling versteht man, dass sich die Fläche<sub>Lee</sub> um das gleiche Maß erweitert, das das Lumen durch IH abgenommen hat. Das neointimale Wachstum wird vollständig ausgeglichen, die Lumengröße bleibt unverändert, und es entsteht keine Stenose. Kommt es zu günstigem Remodeling, weitet sich das Gefäß nur teilweise, und die IH wird in geringerem Maße kompensiert. Das Lumen wird hierbei durch die IH eingeeengt, und es entsteht eine geringe Stenose. Findet kein Remodeling statt, ändert ein Gefäß, in dem sich IH entwickelt, seinen Durchmesser nicht und das Lumen wird von der IH eingeeengt. Verringert sich der Durchmesser eines Gefäßes sogar, spricht man von konstriktivem Remodeling. Die Auswirkungen der IH werden nicht kompensiert sondern durch Kontraktion des Gefäßes noch verstärkt.

GR ist ein kontinuierlicher Prozess, welcher sich zwischen Gefäßvergrößerung auf der einen Seite und Gefäßkontraktion auf der anderen Seite bewegt und so im

Zusammenspiel mit der IH einen nützlichen oder schädlichen Effekt für das Gefäßlumen hat (139).

Die Pathophysiologie des GR ist bislang noch nicht vollständig geklärt (138). Untersuchungen weisen darauf hin, dass GR eine Reaktion auf Veränderungen der Hämodynamik in den Gefäßen wie z.B. Flußgeschwindigkeit, Wandspannung und Scheerkräfte, oder auf humorale Faktoren wie Zytokine und vasoaktive Substanzen darstellt (40, 58, 92).



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung von idealem Remodeling, günstigem Remodeling, kein Remodeling und konstriktivem Remodeling (modifiziert nach Schwartz et al., 1998).

### 1.2.3 Rolle der Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix (ECM) setzt sich im wesentlichen aus Proteinen wie Struktur- (Kollagen, Elastin) und Adhäsionsproteinen (Fibronectin, Vitronectin, Laminin) sowie Polysacchariden wie Glykosaminoglykane (Hyaluronsäure) und Proteoglykane (Chondroitin, Dermatan, Keratinsulfat) zusammen (27).

Änderungen in Aufbau und Zusammensetzung der Matrix können das Wachstum, das Migrationsverhalten und die Differenzierung der Zellen beeinflussen. Matrixproteine können Wachstumsfaktoren binden und Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen steuern (53). Durch Gefäßverletzungen verursachte Veränderungen der ECM tragen so in erheblichem Umfang zu der Wundheilungsreaktion bei (27, 52). Wachstumsfaktoren wie z.B. bFGF werden von verletzten EC, SMC und Myofibroblasten der Gefäßwand sowie von angelagerten Thrombozyten freigesetzt und in der ECM gespeichert. Dadurch werden SMC zu einer gesteigerten Synthese von Matrixproteinen angeregt

(32). Diese von den SMC abgelagerten Matrixproteine definieren die Größe der intimalen Läsion, welche das Gefäßlumen einengt und möglicherweise zu einem endgültigen Verschluss des Gefäßes führt. Die Ablagerung und Resorption dieser neugebildeten Matrixkomponenten sind wichtige Determinanten der IH und des GR (142).

### **1.3 Therapeutische Strategien**

#### **1.3.1 Stand der Forschung**

Die Ausbildung von Restenosen stellt bislang den größten limitierenden Faktor der kardiovaskulären Interventionen dar (32, 79). Die multifaktorielle Pathogenese der Restenosen mit dem Zusammenspiel von verschiedenen Zellenarten wie Thrombozyten, Leukozyten, SMC, Fibroblasten und EC und multiplen Wachstumsfaktoren wie bFGF und PDGF sowie Inhibitoren wie TGF $\beta_1$  und anderen Mediatoren wie z.B. Matrix-Metalloproteinase (MMP) 2 und 9 mag ein Grund dafür sein, dass die meisten therapeutischen Ansätze bislang gescheitert sind (10).

Das Einbringen von metallischen Stents, die das Auftreten von Restenosen verhindern sollen, stellt eines der wenigen Therapiekonzepte dar, das sich im klinischen Alltag etablieren konnte (4, 137). Durch das Einbringen von Stents können die Langzeitergebnisse nach drei Jahren im Vergleich zur alleinigen Ballonangioplastie zwar signifikant verbessert werden (83), die Entwicklung von Restenosen wird aber nicht verhindert, sondern allenfalls verzögert (4, 137). Neue Studien, die das Einbringen von Stents mit der intravaskulären Bestrahlung mit Laserlicht kombinieren, zeigen eine Reduktion der Restenoserate (34). Auch die ersten Langzeitergebnisse dieser Therapie zeigen positive Ergebnisse (35).

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit, die Einzug in die Klinik gehalten hat, ist die Applikation von ionisierenden Strahlen (162). Sie kommt in niedriger Dosierung bei nichtmalignen fibroproliferativen Störungen wie der heterotopen Knochenbildung nach Hüftendoprothetik zum Einsatz (158). Da es sich bei den Mechanismen, die zur Restenose führen, auch um eine fibroproliferative Reaktion auf die Schädigung der Gefäßwand handelt, wurde der Einsatz ionisierender Strahlen untersucht (155). Die Wirkung ist auf die Bildung von freien Radikalen zurückzuführen. Durch diese Radikale werden Nukleinsäuren der Zellen fragmentiert bzw. Mikrotubuli zerstört, die für die Mitose der Zellen wichtig sind, und damit gezielt die Zellteilung behindert (144).

Sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien konnte eine verringerte Ausbildung von IH und Restenosen nach ionisierender Strahlung nachgewiesen werden (126, 162). Eine in-vitro Studie konnte aber zeigen, dass die Gefäßzellen nach Applikation ionisierender Strahlen lediglich in einen Wachstumsstillstand versetzt werden, der aber grundsätzlich reversibel ist (70). Auch hat eine klinische Studie gezeigt, dass es bei Patienten nach intrakoronarer Bestrahlung mit Iridium-192 zu einer höheren Rate von Thrombosen und damit zu Myokardinfarkten kam, als bei Patienten, die keine Bestrahlung erhielten (93). Es ist darum fraglich, ob sich der Einsatz ionisierender Strahlen zur Verhinderung von Restenosen etablieren kann.

Die wichtigsten pharmakologischen Ansätze sind entweder gegen die Zellproliferation und Migration gerichtet, oder sie verhindern die Thrombusformation. So lassen experimentelle Daten vermuten, dass Angiotensin-Converting-Enzym- (ACE) Hemmer antiproliferative, entzündungshemmende und gefäßerweiternde Wirkung haben und im Tierexperiment die Entstehung von IH verhindern können (30). Klinische Studien zeigten aber keinen positiven Nutzen von ACE-Hemmern in Bezug auf die Ausbildung von Restenosen (44). Auch zytotoxische Medikamente wie Colchicin, die die Zellteilung unterdrücken und in experimentellen Modellen gute Ergebnisse zeigten, konnten nicht erfolgreich zur Prävention von Restenosen eingesetzt werden (114). Der Einsatz von Antikoagulantien wie Heparin (128) oder Hirudin, einem Thrombinantagonisten (67), konnte in Langzeitstudien keine Verringerung der Restenoserate bewirken. Auch hier deuteten experimentelle Daten zunächst auf die Wirksamkeit der Medikamente hin (21, 136).

Auf dem Gebiet der Gentherapie werden unterschiedliche Strategien verfolgt, die auf die Zellproliferation und Migration, auf antithrombotische Wirkung und auf eine akzelerierte Reendothelialisierung abzielen (37). Dabei werden zwei Hauptansätze untersucht: einerseits das Einbringen von Genen, die später in das Genprodukt transkribiert werden (19), und andererseits der Einsatz von Antisense Oligonucleotiden zur Unterdrückung von mRNA-Translation (113). Experimentelle Untersuchungen zeigen vielversprechende Ergebnisse, der klinische Einsatz wird zurzeit in Phase-I und Phase-II Studien untersucht (104, 119).

### **1.3.2 Photodynamische Therapie**

Eine vielversprechende Behandlungsmodalität, die das Auftreten von Restenosen verhindern kann, ist die photodynamische Therapie.

PDT nutzt Licht einer im sichtbaren Bereich liegenden Wellenlänge, das von einem normalerweise biologisch inerten, lichtempfindlichen Farbstoff, genannt Photosensitizer (PS), absorbiert wird. Es entstehen freie Radikale, die mit molekularem Sauerstoff freie Sauerstoffradikale bilden. Diese Radikale haben sowohl auf zelluläre Organellen und Membranen, als auch auf Proteine und Lipide eine zytotoxische Wirkung (72).

Das Haupteinsatz- und Forschungsgebiet der PDT lag bislang in der Behandlung von neoplastischen Veränderungen (48). In letzter Zeit wächst aber das Interesse, PDT bei anderen Erkrankungen, die durch zelluläre Proliferation verursacht werden, einzusetzen. So wird der Einsatz von PDT zur Behandlung von Psoriasis (48) und Arthritis (157) intensiv erforscht.

Auch im Kampf gegen IH kommt PDT zur Anwendung. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten experimentell und im Tierversuch zeigen, dass die Ausbildung von IH durch den Einsatz von PDT verhindert werden kann (2, 88). Erste Studien lassen auch auf die klinische Durchführbarkeit von PDT zur Prävention von Restenosen nach Angioplastie hoffen (78, 133).

Der Versuch, IH und die Ausbildung von Restenosen mit dem Einsatz von PDT zu verhindern, basiert auf der Überlegung, dass durch die lokale Zerstörung der SMC an der Stelle der vaskulären Verletzung, die Effektorzellen, die für die Entstehung von IH verantwortlich sind, inaktiviert werden.

1983 zeigte Spears zum ersten Mal, dass ein photosensitives Hematoporphyrinderivat selektiv in den Zellen experimentell erzeugter arteriosklerotischer Veränderungen angereichert wurde (145). Weitere Arbeiten bestätigten die gesteigerte Aufnahme des PS Porphyrin sowohl in nativen als auch in experimentell erzeugten arteriosklerotischen Veränderungen, was auf die hohe mitogene Aktivität von SMC zurückgeführt wurde (103, 117). Die Arbeitsgruppe von Dartsch konnte zeigen, dass SMC, die aus arteriosklerotischen Plaques kultiviert wurden, selektiv durch PDT gehemmt wurden. Dies wurde als Indiz dafür gewertet, dass PDT für die Behandlung von Restenosen, die aufgrund einer vermehrten Proliferation von Zellen der Gefäßwand entstehen, geeignet ist (31).

1992 wurde die erste Arbeit über PDT als Behandlungsmethode der experimentell induzierten IH veröffentlicht (123). Mittels eines Ballonkatheters wurde im Tierversuch die Arteria carotis communis (ACC) von Ratten verletzt, um so die Entstehung von IH zu induzieren. Anschließend wurde das verletzte Gebiet photodynamisch behandelt. Dabei wurden die akuten und subakuten Effekte von PDT auf die Gefäßwand



untersucht. Die PDT-Behandlung resultierte in einer signifikant verringerten Ausbildung von IH nach 14 Tagen. Es waren weder SMC in der Media nachzuweisen, noch zeigten sich Entzündungszellen in dem behandelten Gebiet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten bereits 4 Stunden nach PDT-Applikation eine massive PDT-vermittelte Zytotoxizität. Es konnten jedoch keine histologisch sichtbaren Anzeichen für strukturelle Veränderungen am Kollagen und am elastischen Bindegewebe festgestellt werden. Es war außerdem auffällig, dass nur wenige Thrombozyten an der intimalen Oberfläche hafteten. Die Studie ließ darauf schließen, dass die PDT-induzierte Vernichtung der SMC eine effektive Möglichkeit ist, lokal wichtige Effektorzellen der IH zu eliminieren. Sie kann dabei ohne die Gefahr einer Thrombosierung, Entzündung oder Veränderung der strukturellen Integrität der Gefäßwand angewendet werden.

Nachfolgende Experimente zeigten, dass der PS Chloraluminium-sulfoniertes-Phthalocyanin (CASPc) in der Neointima bevorzugt angereichert wird (89). Es konnte eine um etwa 60% niedrigere Aufnahme von CASPc in gesundem arteriellen Gewebe im Vergleich zu verletztem Gewebe nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse deuten auf die Möglichkeit hin, die Entstehung von IH aufgrund der verstärkten Akkumulation und Retention von CASPc in hyperproliferativem Gewebe mittels PDT selektiv zu verhindern.

In einer weiteren Studie wurde der Langzeiteffekt von PDT auf die verletzte Gefäßwand untersucht (88). Wiederum führte PDT von Ballonkatheter-verletzten ACC der Ratte zu einer vollständigen lokalen Entfernung von medialen SMC. Sequenzielle elektronenmikroskopische Untersuchungen der PDT-behandelten Arterien zeigten, dass nach 4 Wochen eine vollständige Reendothelialisierung der Intima stattgefunden hatte. Die Repopularisierung der Adventitia fand zwischen der 1. und 16. Woche statt. Im Gegensatz dazu war auch nach 16 Wochen keine Wiederbesiedlung der Media durch SMC zu beobachten. Darüber hinaus konnte eine effektive Unterdrückung der IH über den gesamten Zeitraum beobachtet werden. Im Vergleich zu nicht verletzten Arterien zeigten die PDT-behandelten Arterien keinerlei Veränderung des Gefäßdurchmessers. Dies ließ auf eine Erhaltung der strukturellen Integrität ohne Aneurysmaausbildung schließen.

In neuen Studien wird die endovaskuläre Applikation von PDT an Schweine- und Kaninchenarterien, bei der die Bestrahlung mit Hilfe eines Katheters endoluminal direkt



im Anschluss an eine Ballonangioplastie erfolgt, untersucht (77, 116). So sollen perkutane Behandlungsformen für den klinischen Einsatz etabliert werden.

Alle diese Studien belegen, dass PDT an der Gefäßwand zu einer vollständigen Beseitigung der medialen SMC führt. Dabei kommt es weder zu Thrombosierung des Gefäßes, noch kann eine Entzündungsreaktion nachgewiesen werden. Die Depletion der medialen SMC nach PDT blieb dabei über Zeiträume bis 6 Monate bestehen und ist vergesellschaftet mit der Inhibition von verletzungsinduzierter IH.

Mit der Zerstörung der medialen SMC als wichtige Effektorzellen der IH kann die Wirkung von PDT nur teilweise begründet werden. Einer weiterer wichtiger Effekt von PDT ist die Modulation der ECM. In-vitro Studien haben belegt, dass das Wachstumsverhalten von EC und SMC durch PDT von ECM signifikant verändert werden kann (2). So ist die Mitogenese und Migration von SMC auf PDT-behandelter ECM gegenüber unbehandelter ECM signifikant verringert. Demgegenüber sind Mitogenese und Migration von EC auf PDT behandelte ECM signifikant gesteigert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass biologisch-aktive Proteine wie zelluläres bFGF (147), zelluläres TGF $\beta$ <sub>1</sub> (150) sowie zelluläres PDGF (151) nach PDT von SMC inaktiviert wurden. Auch matrix-assoziiertes TGF $\beta$ <sub>1</sub> (148) und bFGF (87) wird nach PDT der ECM inaktiviert. Diese Faktoren werden nach Gefäßverletzung freigesetzt und aktiviert und haben einen regulierenden Einfluss auf den Heilungsprozess. Ein Ungleichgewicht dieser Mediatoren während des Heilungsprozesses wird als einer der Hauptverursacher der IH angesehen (98, 167).

Die vorgelegten Untersuchungen konzentrieren sich auf bFGF, da es ein etablierter, biologisch wichtiger Wachstumsfaktor ist, welcher eine große Rolle bei der Entstehung von IH und bei dem Auftreten von Restenosen spielt (115).

Innerhalb der ersten drei Tage nach Gefäßwandverletzung wird die Entstehung von IH maßgeblich durch das Mitogen bFGF gesteuert (32). bFGF ist sowohl ein Mitogen als auch ein chemotaktischer Mediator der SMC und wird unter anderem von SMC und EC synthetisiert. Er wirkt stimulierend auf die Proliferation und Migration von SMC und EC. bFGF wird durch die Verletzung bzw. den Untergang von Zellen in die Umgebung abgegeben, wobei ein wesentlicher Teil von der ECM gebunden wird (131). Darüber hinaus ist für bFGF eine ATP-abhängiger Exozytosemechanismus beschrieben (49). Es konnte gezeigt werden, dass Matrix-assoziiertes bFGF durch PDT inaktiviert wird (87). Damit können die veränderten Wachstumseigenschaften der SMC nach PDT erklärt werden. Wie sich aber die durch PDT-induzierten Veränderungen der ECM auf die

Zellfunktionen und intrazellulären Mechanismen (z.B. Proteinexpression) auswirkt, konnte bisher nicht geklärt werden.

#### **1.4 Zielsetzung der vorliegenden Studie**

Die Hypothese, die zu der vorliegenden Arbeit geführt hat ist, dass eine Hemmung des positiven Feedbackmechanismus bei der autokrinen Stimulation der SMC eine Rolle bei der PDT-induzierten Hemmung der Proliferation von SMC spielt und damit zur Induktion eines positiven Remodelings führen könnte.

Hierzu sollte untersucht werden ob es nach PDT von ECM zu Proliferationsänderungen kommt und wie die Synthese von bFGF durch SMC verändert wird, um so mögliche Rückschlüsse für die Entstehung eines positiven Remodelings nach in-vivo PDT ziehen zu können. Daraus lassen sich folgende Fragestellungen formulieren:

1. Wie beeinflusst Photodynamische Therapie von extrazellulärer Matrix die Proliferation von normalen, unbehandelten glatten Muskelzellen in-vitro? Lassen sich hieraus Rückschlüsse für die Repopulation der Gefäßwand in-vivo ziehen?
2. Wie beeinflusst Photodynamische Therapie von extrazellulärer Matrix die intrazelluläre bFGF Konzentration in normalen, unbehandelten glatten Muskelzellen in-vitro?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Primärkulturgewinnung

Zur Gewinnung von EC und SMC wurden Aortae thoracicae von frisch geschlachteten Rinderkälbern benutzt.

Hierbei wurden die Aorten herznah aus dem Eingeweidepaket entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in sterile, phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , 8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24g/l  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4, gebrauchsfertige Lösung, Biochrom, Berlin) verbracht.

Die Aortenstücke wurden gründlich mit PBS gespült, und danach unter sterilen Bedingungen die anhaftende Adventitia entfernt. Die Aorten wurden in Längsrichtung entlang der Gefäßabgänge aufgeschnitten, und nach Spülen der Lumenseite mit PBS in sterile Kunststoffrahmen eingespannt. Nach dreimaligem Waschen der luminalen Fläche mit PBS wurden 10ml 37°C warme 0,1% Kollagenaselösung (Typ I, 290IE/mg, in Hanks' balanced salt solution, Sigma, Deisenhofen) in die Rahmen gefüllt und für 12 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die EC wurden durch sanftes Schaben mit kleinen chirurgischen Haken weiter gelöst. Anschließend wurde die Kollagenaselösung in 50ml Zentrifugenröhrchen (Corning, Bodenheim) pipettiert, und 5 Minuten bei 268g und 4°C in einer J6-MC Zentrifuge (Beckmann, München) zentrifugiert. Danach wurden die Zellen dreimal gewaschen. Hierzu wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit kaltem Dulbeccos' Modified Eagle's Medium (DMEM, low glucose, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) resuspendiert und wieder für 5 Minuten bei 268g und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschen wurde das Zellpellet mit 10ml DMEM, supplementiert mit 20% fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin), 200IE/ml Penicillin (Biochrom, Berlin), 200µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin), 200µg/ml Gentamycin (Biochrom, Berlin), 500IE/ml Heparin (Biochrom, Berlin) und 0,6mol/l L-Glutamin (Biochrom, Berlin) resuspendiert und in eine 100mm Zellkulturschale (Corning, Bodenheim) verbracht. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel.

Zur Entfernung der verbliebenen EC wurde die Lumenseite der Aortenstücke mit PBS gewaschen und mit einem Skalpell (Feather, Köln) bis auf die Tunica Media freigeschabt.

In Anlehnung an die Explantmethode von Grunwald (66) wurden 20 etwa 3mm große Stücke aus der Media flach herausgeschnitten und in eine 100mm Zellkulturschale verbracht. Die Schale wurde mit etwa 3ml DMEM, supplementiert mit 20% FCS, 200IE/ml Penicillin, 200µg/ml Streptomycin, 200µg/ml Gentamycin und 0,6mol/l L-Glutamin beschickt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Mediastücke am Boden der Schale haften blieben und nicht im Kulturmedium schwammen. Nach dem Auswachsen der SMC wurden die Mediastücke mit sterilen Pinzetten entfernt.

Bis zur ersten Subkultivierung wurden die Primärkulturen mit dem oben genannten Medium versorgt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Heraeus, Düsseldorf) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage.

### **2.1.2 Zellkultivierung**

Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank LaminAir (ELB 2448, Heraeus, Düsseldorf) durchgeführt.

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen der Größe T75 – T225 (Corning, Bodenheim) mit DMEM, supplementiert mit 10% FCS, 100IE/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 0,6mol/l L-Glutamin im Brutschrank kultiviert. Bei EC der Passage 1 wurde zusätzlich 500IE/ml Heparin zur Unterdrückung eventuell enthaltener SMC zugesetzt. Ein Wechsel des jeweiligen Mediums erfolgte alle 3-4 Tage.

Nach Erreichen des Stadiums der Konfluenz wurden die Kulturen nach Trypsinisierung subkultiviert. Dafür wurde der Boden der Zellkulturflasche nach Entfernung des Mediums mit 10ml 37°C warmen PBS gespült. Anschließend wurden etwa 3ml 37°C warme Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02% in PBS, Biochrom, Berlin) in die Zellkulturflaschen gegeben. Nachdem sich die Zellen nach ca. 10 Minuten Inkubation im Brutschrank vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden 10ml auf 37°C angewärmtes Kulturmedium zur Inhibierung der Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche gegeben, und die Zellen darin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:6 auf neue Kulturflaschen verteilt. Zur Versuchsdurchführung wurden Zellen aus der 2. bis 5. Passage benutzt.

### 2.1.3 Zellcharakterisierung von EC

Zur Charakterisierung der EC wurde ein acetyliertes Low Density Lipoprotein, markiert mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethyl-Indocarbocyanin Perchlorat (Di-I-Ac-LDL, Paesel & Lorie, Hanau) verwendet.

Di-I-Ac-LDL ist spezifisch für vaskuläre EC und Makrophagen, wobei es speziell für bovine, aortale EC getestet ist (161). Dabei verstoffwechseln die Zellen das Lipoprotein und reichern den Fluoreszenzfarbstoff (Di-I) in der Intrazellulärmembran an. Makrophagen und EC können durch ihre unterschiedlich starke Markierung unterschieden werden.

Jede Zellcharge wurde beim Anlegen der Passage 1 getestet. Dazu wurden die EC in 3mm Zellkulturschalen (Corning, Bodenheim) subkultiviert und bis zur 2/3 Konfluenz in Kultur gehalten. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und durch 2ml Medium, versetzt mit 10µg/ml Di-I-Ac-LDL, ausgetauscht. Als Negativkontrolle wurde Medium ohne Di-I-Ac-LDL benutzt. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Wachstumsfläche dreimal 5 Minuten mit jeweils 2ml PBS gespült.

Es folgte die Betrachtung der Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena). Dabei wurden die fluoreszierenden Farbstoffmoleküle mit Licht einer Quecksilberdampfampe (DOB 50, Zeiss, Jena) mit einem Spektrum von 450nm - 490nm Wellenlänge angeregt. Sie leuchteten in der für sie charakteristischen grünen Farbe (Abbildung 3.2, 3.3).

Um eine Kontamination mit SMC auszuschließen, wurde jede verwendete EC-Charge auch auf SMC untersucht (siehe 2.1.4).

### 2.1.4 Zellcharakterisierung von SMC

SMC wurden durch einen monoklonalen  $\alpha$ -Actin-Antikörper, konjugiert mit Fluoreszein Isothiocyanat Isomer I (FITC, Sigma, Deisenhofen) charakterisiert.

Der Antikörper, der für das bovine System getestet ist, erkennt spezifisch die  $\alpha$ -Isoform des Aktins glatter Muskelzellen und besitzt keine Kreuzreaktivität mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -zytoplasmatischen (Fibroblasten und Epithelzellen),  $\alpha$ -sarkomerischen (quergestreifte Muskelzellen),  $\alpha$ -myocardialen (Myocardzellen) Isoformen des Aktins (143).

Zur Charakterisierung wurden SMC beim Anlegen der Passage 1 in 30mm Zellkulturschalen subkultiviert und bis zur 2/3 Konfluenz in Kultur gehalten.

Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurde der Boden der Zellkulturschale dreimal 15 Minuten mit jeweils 2ml PBS gespült. Zur Fixierung der Zellen wurde 250µl Formalin (4% in PBS, Sigma, Deisenhofen) aufgegeben und für 5 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 2ml PBS für jeweils 5 Minuten folgte eine 5 Minuten Inkubation mit 250µl Triton X 100 (0,1% in PBS, Sigma, Deisenhofen) zum Aufschluss der Zellmembran. Nach weiteren 3 Waschschritten mit 2ml PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Zellen mit 250µl  $\alpha$ -Actin-Antikörper (1:250 in PBS, 10% FCS) für 30 Minuten bedeckt. Während der Inkubationszeit wurden die Schalen vor Umgebungslicht geschützt. Als Negativkontrolle wurde PBS mit 10% FCS ohne  $\alpha$ -Actin-Antikörper verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit 2ml PBS für 5 Minuten folgte eine Kerngegenfärbung mit 250µl Ethidium Bromid (40µg/ml in PBS, Sigma, Deisenhofen) für 30 Sekunden. Anschließend wurde die Schale dreimal mit reichlich PBS gespült.

Es folgte die Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop (siehe 2.1.3, Abbildung 3.5, 3.6).

Um eine Kontamination mit EC auszuschließen, wurde jede verwendete SMC-Charge auf EC untersucht (siehe 2.1.3).

### **2.1.5 Zellzahlbestimmung**

Vor der Bestimmung der Zellzahl musste eine Einzelzellsuspension der Zellen hergestellt werden. Dafür wurden die Zellen durch Trypsinisierung gelöst und in Kulturmedium resuspendiert (siehe 2.1.2). Die Suspension wurde daraufhin in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 268g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 50ml kaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 Minuten bei 268g und 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet, entsprechend der erwartenden Zellzahl in 5 bis 10ml Kulturmedium gründlich resuspendiert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Durchflußzytometer Partec Cell Counter Analyser (CCA, Partec, Münster).

Für die Bestimmung wird die DNA der Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI (Partec, Münster) gefärbt. DAPI dringt in die Zellen ein und lagert sich an die DNA an. Die eingelagerte Farbstoffmenge ist dabei proportional dem DNA-Gehalt der jeweiligen Zelle. Die Zellen werden im CCA einzeln mit Licht der Wellenlänge 435nm beleuchtet, um die fluoreszierenden Farbstoffmoleküle anzuregen. Bei der Zellzählung

wird in einem exakten Probenvolumen jede Zelle, die das charakteristische Fluoreszenzlicht aussendet gezählt und anhand der Lichtintensität der DNA-Gehalt jeder Zelle bestimmt.

200µl der Zellsuspension wurden in einem 5ml Probenröhrchen (Eppendorf, Hamburg) mit 600µl DAPI (Verhältnis 1:4) sorgfältig gemischt. Anschließend wurde die Probe im CCA gemessen.

Die vom CCA angegebene Zellzahl/ml musste anschließend um den Verdünnungsfaktor 4 des DAPI berichtigt werden. Bei der Probenaufarbeitung gelang es meist nicht, eine aggregatfreie Suspension herzustellen. Mikroskopische Kontrollen ergaben, dass die Zellsuspension nach der Probenaufarbeitung noch vereinzelte Konglomerate, bestehend aus zwei oder mehr Zellen enthielt. Zellen, für die der CCA doppelten oder dreifachen DNA-Gehalt anzeigte, wurden daraufhin als zwei bzw. drei Zellen interpretiert und das Zählergebnis dahingehend korrigiert. Für jede Zellsuspension wurde die Zellzahl im Triplikat bestimmt und anschließend der Mittelwert der Zählungen gebildet.

## **2.2 Präparation der Extrazellulärmatrix**

Für die Herstellung von ECM wurde eine EC-Zellsuspension mit einer Dichte von  $3,3 \times 10^5$  Zellen/ml Kulturmedium (10% FCS) hergestellt (siehe 2.1.5). Mit 1,5ml ( $5 \times 10^5$  Zellen pro Well) dieser Suspension wurden in 6-Well-Platten (Corning, Bodenheim) neue Kulturen angelegt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden diese Kulturen für 5 Tage weitergeführt, ein Mediumwechsel mit 1,5ml Kulturmedium/Well erfolgte alle 48 Stunden.

Die Isolierung der ECM erfolgte nach etablierter Methode (2) unter sterilen Bedingungen.

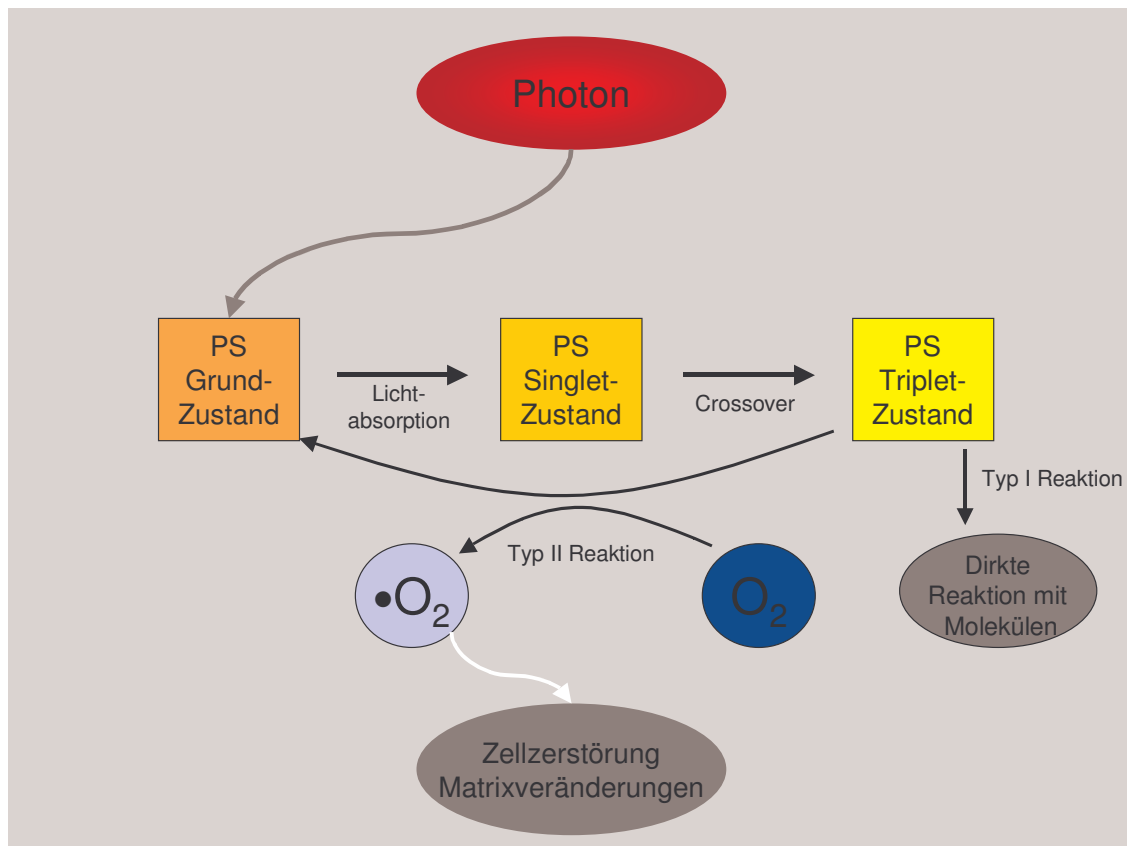
Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen für 5-10 Minuten mit 0,5% TritonX-100 und 20mmol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$  (in Aqua dest., sterilfiltriert, Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Durch leichtes Schwenken der Platte wurde das Zellmonolayer vom Boden der Platten gelöst und konnte mit Pasteurpipetten abgesaugt werden. Dieser Schritt wurde mikroskopisch verfolgt. Anschließend wurde die am Boden der Wells verbliebene ECM dreimal mit 2ml PBS gespült. Die ECM wurde dann mit 1,5ml PBS bedeckt, und die Platten bei 4°C gelagert. Die Weiterverwendung der ECM erfolgte innerhalb von 48 Stunden.

## 2.3 Photodynamische Therapie

### 2.3.1 Grundlagen

Photodynamische Therapie nutzt Licht, das von einem weitgehend biologisch inerten, lichtempfindlichen Farbstoff (PS), absorbiert wird. Nimmt der PS Licht der geeigneten Wellenlänge auf, wird er von seinem elektrochemisch stabilen Grundzustand in einen aktiven Zustand umgewandelt. Dabei geht der PS zum größten Teil über einen kurzlebigen einfach angeregten Zustand (excited singlet state) in einen dreifach elektrisch angeregten Zustand über (triplet-state) (72). Auf diesen Triplet-Zustand können nun zwei verschiedene Reaktionen folgen (Abbildung 2.1) (72):

Typ I-Reaktion: Der aktivierte PS reagiert direkt mit anderen Molekülen wie Aminosäuren, Tryptophan, Cystein oder Radikalfänger wie Betakarotin oder  $\text{NaN}_3$  und bildet freie Radikale (72).



**Abbildung 2.1** Schema der photochemischen Reaktionen Typ I und Typ II, welche für die Zytotoxizität verantwortlich gemacht werden.

PS Photosensitizer,  $\text{O}_2$  molekularer Sauerstoff,  $\bullet\text{O}_2$  Sauerstoffradikal



Typ II-Reaktion: Der aktivierte PS reagiert mit molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ), wobei hochreaktive Sauerstoffradikale ( $\bullet O_2$ ) entstehen (51).

Die Typ I- und Typ II-Reaktion können dabei gleichzeitig nebeneinander ablaufen, wobei angenommen wird, dass die Wirkung zum größeren Teil durch die entstandenen Sauerstoffradikale vermittelt wird (125). Die bei dem photochemischen Prozess entstandenen Radikale wirken durch Schädigung von Zell- und Organellmembranen in hohem Maße toxisch auf Zellen (111) oder bewirken Veränderung an der ECM (2). Dabei kommt es zu einer photochemisch induzierten Peroxidation des membranständigen Cholesterols und anderer ungesättigter Phospholipide. Veränderungen in der Membranpermeabilität und Crosslinks von Aminopeptiden und Polypeptiden sind die Folge (59). Darüber hinaus kommt es zur Inaktivierung von membranassoziierten Enzymsystemen und Rezeptoren (59).

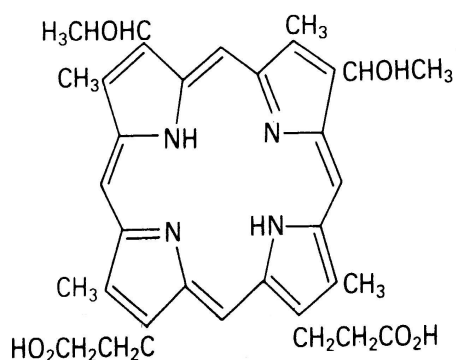
Freie Radikale werden nur dort produziert, wo Bestrahlung stattfindet. Hinzu kommt, dass die freien Radikale eine extrem kurze Halbwertszeit (ns bis ms) (72) und Diffusionsdistanz aufweisen (111). So treten die durch sie vermittelten Effekte nahe ihres Entstehungsortes auf. Dies lässt einen lokalisierten und selektiven Einsatz von PDT zu.

Essentiell für einen erfolgreichen Einsatz von PDT ist die Wahl der Bestrahlungsenergie, da es ab einer gewissen Schwelle zu Gewebnekrosen kommt (46, 125). Sobald diese PDT-Dosis erreicht ist, ist der Verlust der Zellintegrität die Folge. Mit geringeren PDT-Dosen, ist für viele Zellarten auch ein Zelltod durch Apoptose beschrieben (90).

### **2.3.2 Photodynamische Therapie der Extrazellulärmatrix**

Die PDT der ECM erfolgte in Anlehnung an die von Adili und Mitarbeitern etablierte Methode (2).

Als Photosensitizer wurde Chloraluminium sulfoniertes Phthalocyanin (CASPc, Novartis, Basel, Schweiz) verwendet (siehe Abbildung 2.2). CASPc gehört zu der synthetisch hergestellten Gruppe der Porphyrine, deren Struktur genau definiert ist (146). Das Grundgerüst bildet ein Ringsystem aus vier Pyrrolringen, welches mit Aluminium Chelate bildet (12). Die Sulfonierung wurde durch Bedampfung des Aluminium- Phthalocyanins mit Schwefelsäure erreicht (12). CASPc ist ein Gemisch aus mono-, di-, tri- und tetra-sulfonierten Formen,



**Abbildung 2.2 Strukturformel** Chloraluminum sulfoniertes Phthalocyanin (tri-sulfonierte Form ist dargestellt)

die im Mittel über drei Schwefelsäuregruppen pro Molekül verfügen (12). Diese chemisch stabile, einfach herzustellende monomere Form ist direkt in Wasser löslich (12). CASPc hat im Vergleich zu Photofrin II (PF) eine bessere Lichtabsorption (molarer Extinktionskoeffizient  $[\epsilon] = 8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), wird mit Licht der Wellenlänge von 675nm angeregt (82) und hat als angeregter Triplet-Zustand eine Halbwertszeit von etwa 510 $\mu\text{s}$  (12). CASPc bindet spezifisch an Albumin und andere Proteine (135) und wird in Tumoren bis zu fünfmal stärker gespeichert als PF (132). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CASPc in IH-Gewebe bevorzugt angereichert wird (89).

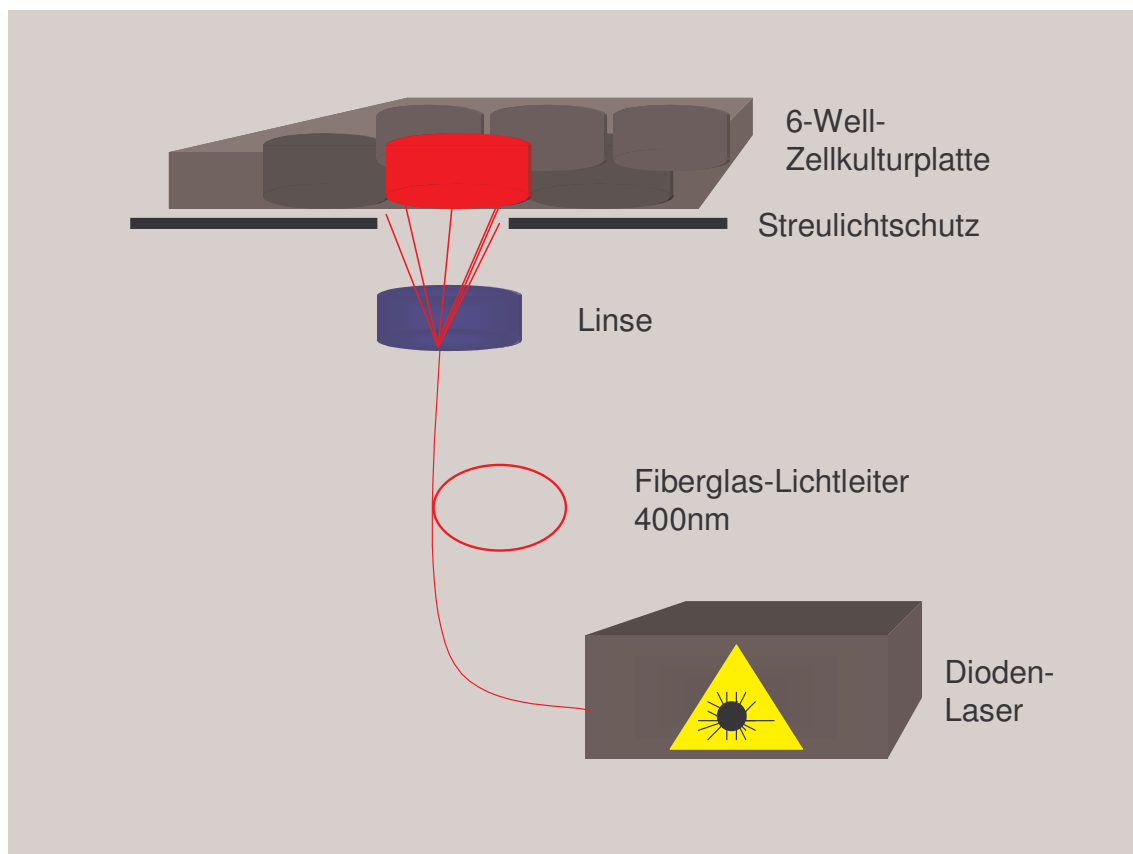
Alle Arbeiten mit dem PS wurden unter Lichtabschluss durchgeführt und die Zellkulturplatten nur unter sterilen Bedingungen geöffnet.

Vor dem Beginn der Untersuchungen wurde eine Stammlösung des PS hergestellt (1mg/ml in PBS), sterilfiltriert und in Aliquots von je 1ml bei -70°C lichtgeschützt gelagert. Alle Versuche wurden mit der gleichen Stammlösung durchgeführt. Unmittelbar vor der Behandlung wurde die Stammlösung mit sterilem PBS verdünnt (5 $\mu\text{g/ml}$ ), und jedes zu bestrahlende Well mit 1,0ml der Arbeitslösung bedeckt. Um die Auswirkungen isolierter Laserbestrahlung zu untersuchen, wurden ECM mit 1,0ml PBS, das kein CASPc enthielt, bedeckt und anschließend bestrahlt (LO). Um die alleinige Wirkung des PS zu untersuchen, wurden ECM mit 1,0ml CASPc bedeckt, und für 1h bei Dunkelheit inkubiert, ohne dass eine Bestrahlung folgte (DT).

Die Bestrahlung wurde mit einem Diodenlaser PDT 675/5 (Applied Optronics Corp., South Plainfield, New Jersey, USA) durchgeführt. Dieser Laser erzeugte Licht der Wellenlänge 675nm. Am Ende des Glasfaser-Lichtleiters ( $\varnothing$  400 $\mu\text{m}$ , AOC DBLF/40, Applied Optronics Corp., South Plainfield, New Jersey, USA) befand sich eine

Streulinse, die so ausgerichtet war, dass genau die Grundfläche ( $9,62\text{cm}^2$ ) eines Wells der 6-Well-Zellkulturplatte ( $\varnothing 3,5\text{cm}$ ) homogen bestrahlt werden konnte (Abbildung 2.3). Die Bestrahlungsenergie war mit  $100\text{J}/\text{cm}^2$  so gewählt, dass die in vivo therapeutisch wirksame Dosis erreicht wurde (123). Außerdem war bei dieser Dosis nicht mit thermischen Effekten zu rechnen (11). Die Ausgangsleistung des Lasers wurde dafür mit Hilfe eines Powermeters (Power-Meter-Lasermate, Coherent, Dieburg) auf  $962\text{mW}$  eingestellt, woraus eine Dosisleistung von  $100\text{mW}/\text{cm}^2$  resultierte. Die Bestrahlungszeit jedes Wells betrug 1000 Sekunden, so dass die Gesamtenergie der Behandlung bei  $100\text{J}/\text{cm}^2$  lag (Bestrahlungsenergie [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ] = (Leistung [ $\text{W}$ ] x Zeit [ $\text{s}$ ]) / Fläche [ $\text{cm}^2$ ]).

Die Zellkulturplatten wurden vor und nach der Bestrahlung in Aluminium-Folie verpackt, um sie vor Umgebungslicht zu schützen. Nach der Behandlung wurde die ECM dreimal mit je  $1,5\text{ml}$  sterilem PBS gespült und bei Raumlicht weitergearbeitet.



**Abbildung 2.3** Versuchsaufbau der Photodynamischen Therapie der Extrazellulärmatrix

## 2.4 Proliferationsassay mit 5% FCS im Kulturmedium

Aus nahezu konfluenten Kulturen von SMC wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von  $1,3 \times 10^5$  Zellen/ml Kulturmedium (5%FCS) hergestellt (siehe 2.1.5). Jeweils 1,5ml ( $2 \times 10^5$  Zellen pro Well) dieser Suspension wurden in 6-Well-Platten gegeben, die unbehandelte ECM enthielt. Zusätzlich wurden Kulturen in ECM freie, unbehandelte 6-Well-Platten (PL) sowie in Platten die PDT-behandelte ECM, LO-behandelte ECM und DT-behandelte ECM enthielten (siehe 2.3.2), angelegt. Die Zellen wurden für 24, 48 bzw. 72 Stunden in Kultur gehalten.

Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde das Zellkulturmedium verworfen, jedes Well mit 1,5ml 37°C warmen PBS gespült und danach 250µl 37°C warme Trypsin/EDTA-Lösung aufgegeben. Nach 10 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde 1,5ml/Well DMEM (supplementiert mit 5% FCS) hinzugegeben und die Zellen darin sorgfältig resuspendiert. Die Suspension wurde in 5ml Probenröhrchen überführt, für 5 Minuten bei 268g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 3ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Um eine Doppelzählung durchführen zu können, wurde das Pellet nun in 400µl PBS und 1200µl DAPI sorgfältig resuspendiert, die Zellsuspension auf zwei 5ml Probenröhrchen aufgeteilt und die Proben im CCA analysiert.

Die angezeigte Zellzahl/ml wurde wie oben beschrieben, korrigiert (siehe 2.1.5), und der Mittelwert der beiden Zählungen gebildet. Unter Berücksichtigung des eingesetzten Probenvolumens wurde das Zählergebnis in Zellen/Well umgerechnet.

Um die einzelnen Untergruppen (PDT, KO, PL, DT, LO) verschiedener Versuche miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellzahlen der einzelnen Gruppen in Bezug zur Zellzahl der KO-Gruppe gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent (%) und die Standardabweichung (SD) .

## 2.5 Gewinnung des Untersuchungsmaterials mit 0,5% FCS im Kulturmedium

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde bei nahezu konfluenten Kulturen von SMC der FCS-Gehalt des Kulturmediums auf 0,5% gesetzt. Aus diesen Kulturen wurde eine Zellsuspension von  $1,3 \times 10^5$  Zellen/ml Kulturmedium (0,5%FCS) hergestellt (siehe 2.1.5). Jeweils 1,5ml ( $2 \times 10^5$  Zellen pro Well) dieser Suspension wurden in 6-Well-Platten gegeben, die unbehandelte ECM enthielt. Zusätzlich wurden Kulturen in ECM freie, unbehandelte 6-Well-Platten (PL) sowie in Platten die PDT-behandelte ECM, LO-

behandelte ECM und DT-behandelte ECM enthielten (siehe 2.3.2), angelegt. Die Zellen wurden für 24, 48 bzw. 72 Stunden in Kultur gehalten.

Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Zellen mit 250µl Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in 2,0ml Reagiergefäße (Eppendorf, Hamburg) gegeben und anschließend für 5 Minuten bei 268g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1,5ml kaltem PBS resuspendiert und wiederum für 5 Minuten bei 268g und 4°C zentrifugiert.

Die Zellysierung erfolgte in Anlehnung an die von Kossodo und Mitarbeitern etablierte Methode (33).

Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in 150µl kaltem Probenpuffer (20x SSC (175g/l NaCl; 88,25g/l  $C_6H_5Na_3O_7$ , Sigma, Deisenhofen) verdünnt 1:10 mit 0,4M Tris-HCl (48,44g/l, pH 7,4 eingestellt mit 1M HCl, Sigma Deisenhofen)) aufgenommen.

Die Proben wurden gründlich mit einem Schüttler (Vibrofix VF1 Electronic, Janke&Kunkel, Staufen) gemischt. Für den mechanischen Aufschluss der Zellmembran wurden die Proben danach für ca. 20 Sekunden in flüssigen Stickstoff gehalten. Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurde dieser Vorgang zweimal wiederholt.

Zur Entfernung der Zelltrümmer wurden die Proben anschließend für 10 Minuten bei 14000g und 4°C in einer Biofuge 15R (Heraeus, Düsseldorf) zentrifugiert, der Überstand in 0,5ml Reagiergefäße (Eppendorf, Hamburg) gegeben und auf Eis gelagert. Es folgte die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Proben (siehe 2.6).

Zur Hitzeinaktivierung der Proteasen wurden die Proben in einem Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und danach erneut für 10 Minuten bei 14000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 0,5ml Reagiergefäße gegeben. Erfolgte die Weiterverarbeitung der Proben nicht direkt, wurden sie bei -70°C gelagert.

## **2.6 Bestimmung des Gesamtproteingehalts**

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) bestimmt.

In diesem Test, der auf der Methode von Bradford basiert (13), dient eine saure Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 als Substrat. Das Absorptionsmaximum dieses Substrats verschiebt sich nach Bindung an Protein von 465nm nach 595nm. Der

Gesamtproteingehalt der Probe ist dabei direkt proportional zu der gemessenen Extinktion bei 595nm.

Um den Gesamtproteingehalt der Proben quantitativ zu erfassen, wurden bei jedem Proteinassay Standardproben mit definiertem Proteingehalt mitbestimmt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des Protein Standard II (bovines Albumin (BSA), lyophilisiert, 1,4mg/ml, Bio-Rad, München) in Probenpuffer mit einem BSA-Gehalt von 300µg/ml bis 20 µg/ml. Als Leerwert wurde Probenpuffer eingesetzt.

15µl Standard, Probe und Leerwert wurden in jedes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Corning, Bodenheim) gegeben und mit 200µl Assay-Substrat gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595nm in einem Microtiter-Plate-Reader (Bio-Rad, München) bestimmt.

Alle Messungen wurden in Triplikat durchgeführt. Aus den gemessenen Werten wurde der Mittelwert berechnet, und von den Extinktionen der Leerwert subtrahiert. Aus den mitbestimmten Standardproben wurde eine Standardkurve angelegt. Anhand dieser Kurve wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben berechnet und in µg/ml angegeben. Ähnlich wie im Proliferationsassay (siehe 2.4) wurde der Proteingehalt der einzelnen Untergruppen in Bezug zum Proteingehalt der KO-Gruppe gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent (%) und die Standardabweichung (SD) .

## **2.7 Bestimmung des intrazellulären bFGF-Gehalts**

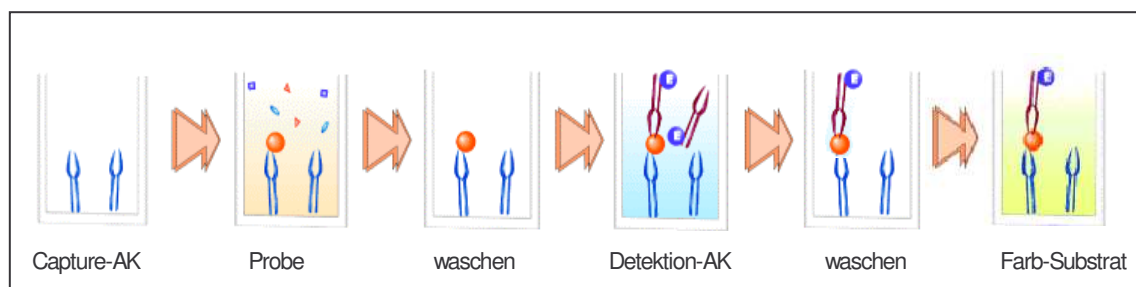
Der bFGF-Gehalt der Proben wurde mit dem Quantikine Human FGFbasic Immunoassay DFB50 (R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt. Alle in diesem Abschnitt erwähnten Reagenzien sind Bestandteil dieses kommerziell erwerblichen Kits.

Der Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) basiert auf der Spezifität und Affinität eines Antikörpers zu seinem Antigen. Der hier verwendete ELISA ist in Sandwich-Form aufgebaut und besteht aus zwei monoklonalen Antikörpern gegen humanes, rekombinantes bFGF. Dem Capture-Antikörper (Mouse IGG 2b, Clone 10060,11), mit dem eine 96-Well-Mikrotiterplatte beschichtet ist und dem Detektion-Antikörper (Mouse IGG 2a, Clone 10043,111), der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist.

Wird das Antigen in das Well gegeben, so wird es vom immobilisierten Capture-Antikörper gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen ausgewaschen sind, bindet der danach zugegebene Detektion-Antikörper an das Antigen und bildet einen

Antigen-Antikörper-Komplex. Nachdem wiederum alle ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexe entfernt sind, reagiert die Meerrettich-Peroxidase mit einem zugegebenen Substrat mit einer Farbentwicklung, die direkt proportional zu der Antigenkonzentration in der Probe ist (Abbildung 2.4).

Der ELISA hat eine 100% Kreuzreaktion mit bovinem bFGF. Er zeigt dagegen nahezu keine Kreuzreaktivität zu andere bFGF-Formen (0,15% zu bovinem aFGF, 0,02% zu rhFGF-4, Angaben des Herstellers).



**Abbildung 2.4** Reaktionsschema ELISA [R&D Cytokine Bulletin, Winter 1994]

Um den bFGF-Gehalt der Proben quantitativ zu erfassen, wurden bei jedem ELISA Standardproben mit definiertem bFGF-Gehalt mitbestimmt. Als Standard diente rekombinantes, humanes bFGF, von dem eine Verdünnungsreihe von 320pg/ml bis 10pg/ml in Calibrator Diluent RD5-14 (PBS, 0,01% BSA) hergestellt wurde. 50µl jeder zu bestimmende Probe wurden mit 150µl Calibrator Diluent verdünnt (Verdünnung 1:4) und sorgfältig gemischt.

100µl Assay Diluent RD1-43 und 100µl Standard oder Probe wurden in jedes Well der 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Als Leerwert wurden 100µl Calibrator Diluent eingesetzt. Standards, Proben und der Leerwert wurden doppelt aufgetragen. Die Platte wurde anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach viermaligem gründlichen Waschen mit ca. 200µl/Well Wash Buffer (0,05% Tween 20 in PBS, pH7,4) wurde in jedes Well 200µl Detektion-Antikörper-Konjugat gegeben und für weitere 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Platte erneut viermal gründlich gewaschen.

Als Farb-Substrat wurde eine Arbeitslösung aus Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidin) im Verhältnis 1:1 hergestellt und 200µl dieses Substrats in jedes Well geben. Nach 20 Minuten Inkubation wurde die Farbentwicklung mittels 50µl/Well Stopplösung (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt.



Die Absorbtion wurde bei 450nm im Microtiter-Plate-Reader (Biorad, München) bestimmt.

Aus den gemessenen Wertepaaren der jeweils doppelt aufgetragenen Proben wurde der Mittelwert berechnet und von den Extinktionen der Leerwert subtrahiert. Aus den mitbestimmten Standardproben wurde eine Standardkurve angelegt. Anhand dieser Kurve wurde die bFGF-Konzentration der einzelnen Proben bestimmt. Das ermittelte Ergebnis musste um den Verdünnungsfaktor 4 (s.o.) berichtigt werden.

Um die Werte der einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, musste der bFGF-Gehalt der Probe in Bezug zu dem vorher bestimmten Gesamtproteingehalt der Probe gesetzt und in bFGF/Gesamtprotein (pg/ $\mu$ g) angegeben werden (33).

Anschließend wurde der bFGF-Gehalt der einzelnen Untergruppen wieder in Bezug zur KO-Gruppe gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent (%) und die Standardabweichung (SD) .

## 2.8 Statistik

Alle Parameter und Messwerte sind jeweils als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SD) angegeben. Bei paarweise Vergleichen kam ein zweiseitiger Student-t-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung. Bei Vergleichen mehrerer Gruppen (KO, PDT, LO, DT, PL) wurde ein univariater ANOVA mit Tukey's HSD posthoc-Test für ungleiche n-Zahlen (Spjotvoll/Stoline) angewendet, um festzustellen, zwischen welchen der Versuchsgruppen statistisch unterschiedliche Ergebnisse auftraten.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Software (Statistica, Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit für den  $\alpha$  -Fehler von  $\leq 0,05$  wurde die Null-Hypothese verworfen, die geprüften Daten als statistisch signifikant unterschiedlich angesehen.



### 3 Ergebnisse

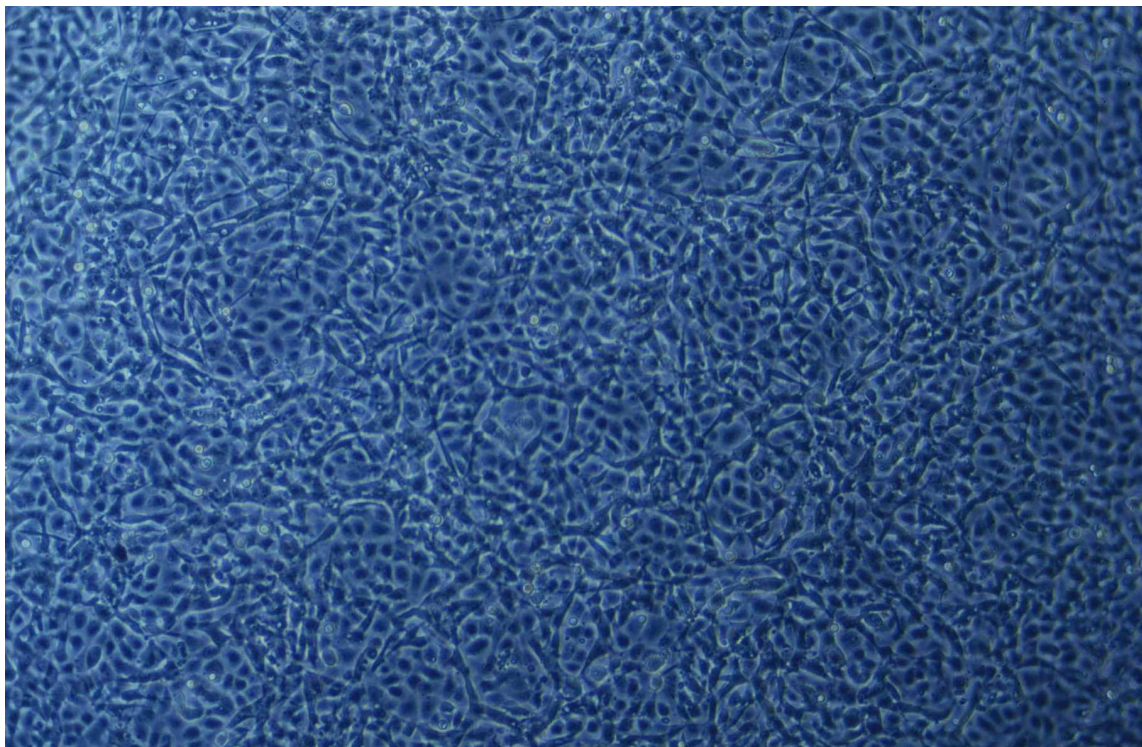
#### 3.1 Zellcharakterisierung

##### 3.1.1 Zellcharakterisierung von EC

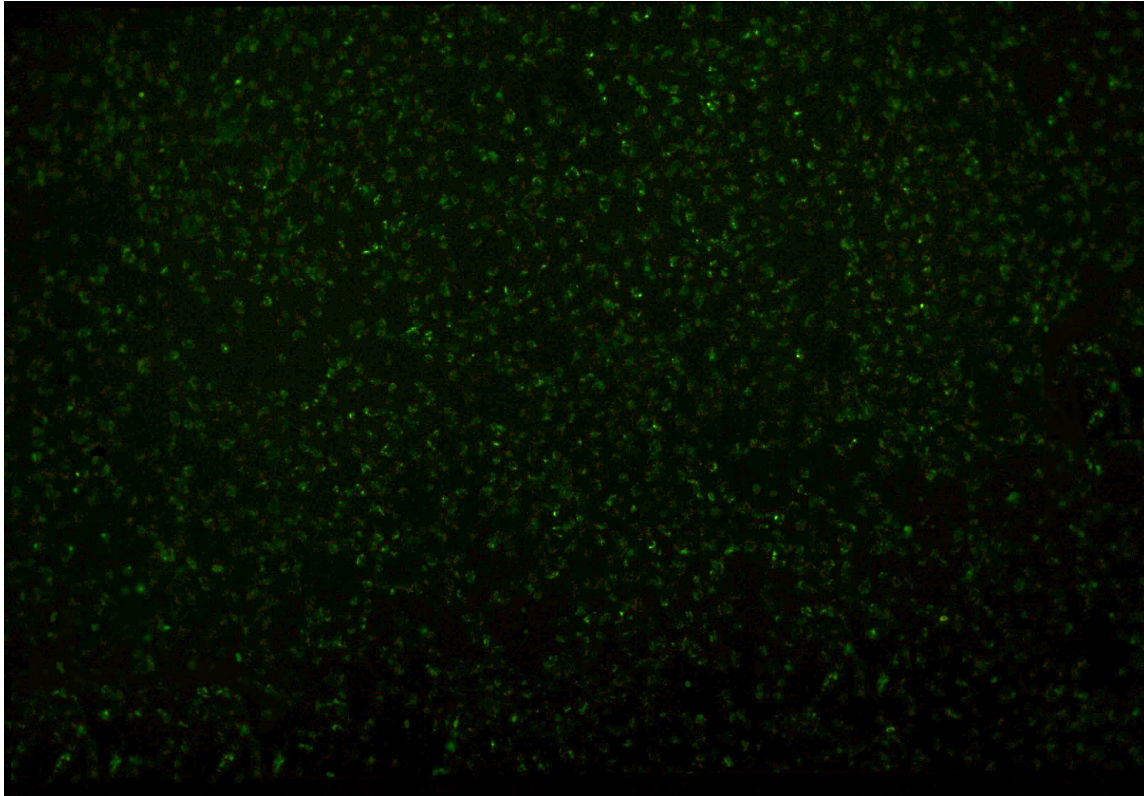
Die Identität der EC wurde durch die lichtmikroskopische Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Dabei zeigten die Zellen ihre typisches polygonales Monolayer („Cobblestone-Muster“) (Abbildung 3.1).

Zusätzlich wurden die EC durch die Aufnahme von fluoreszierendem Di-I-Ac-LDL immuncytochemisch charakterisiert (Abbildung 3.2, 3.3).

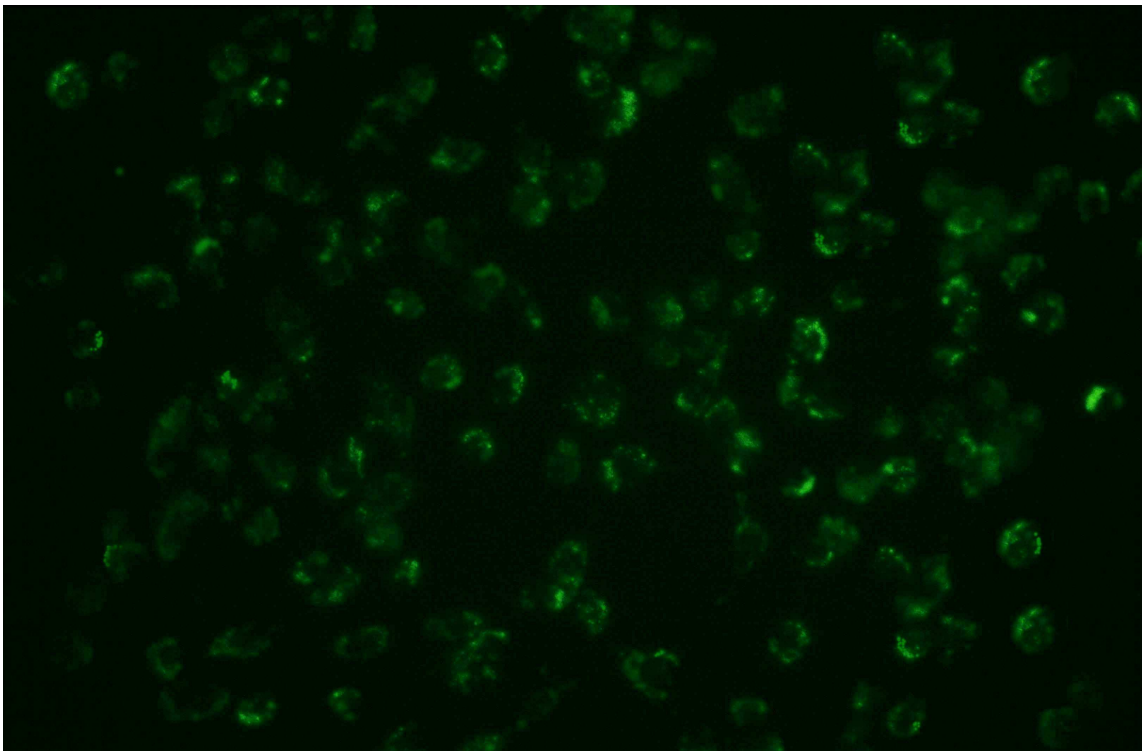
Für die Versuche wurden nur eindeutig identifizierte Zellen verwendet, die auch hinsichtlich einer Kontamination mit SMC geprüft wurden.



**Abbildung 3.1** Bovine EC, Phasenkontrast Originalvergrößerung x25



**Abbildung 3.2** Bovine EC, immunzytochemische Färbung mit Di-I-Ac-LDL  
Originalvergrößerung x25



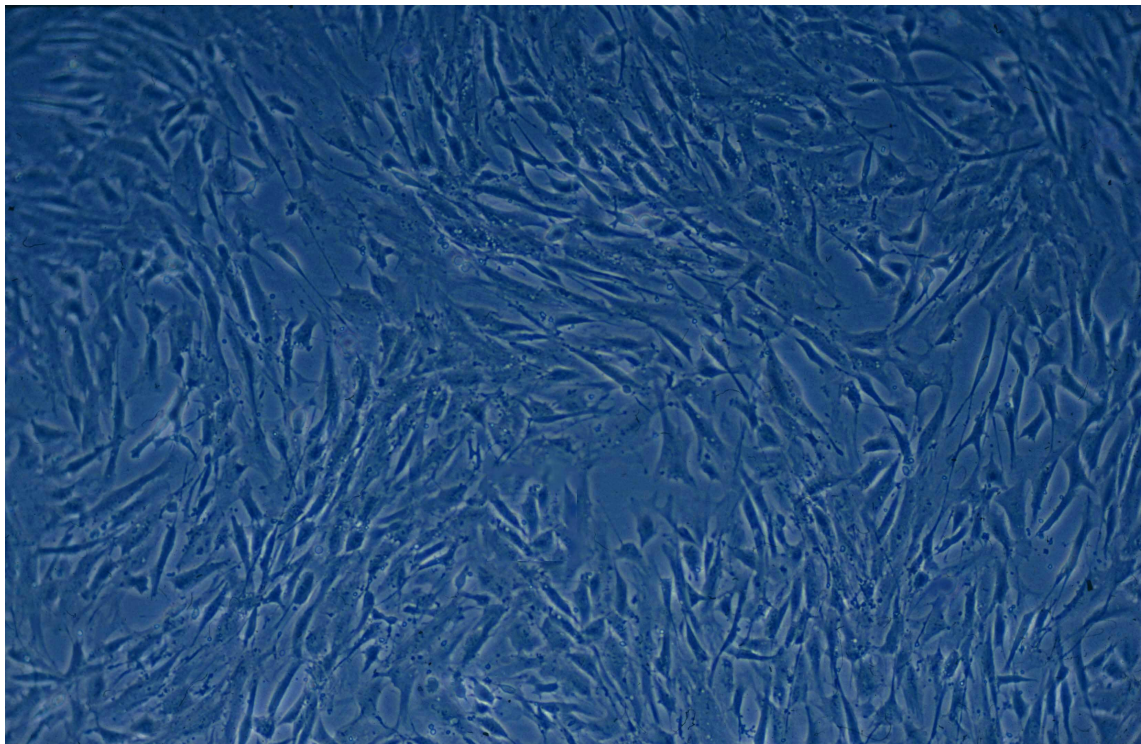
**Abbildung 3.3** Bovine EC, immunzytochemische Färbung mit Di-I-Ac-LDL  
Originalvergrößerung x50



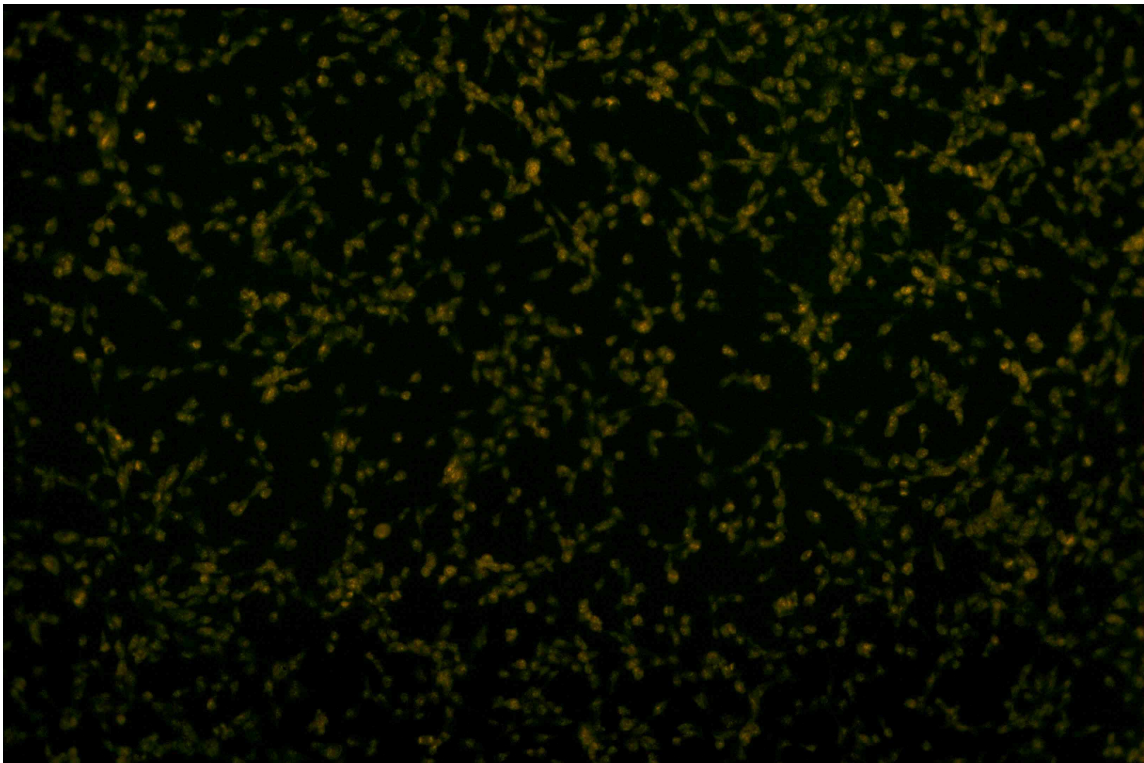
### 3.1.2 Zellcharakterisierung von SMC

Auch die Identität der SMC wurde durch die lichtmikroskopische Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Dabei zeigten die Zellen ihr typisch langgestrecktes Wachstumsmuster und die charakteristische „Hill and Valley Formation“ (Abbildung 3.4).

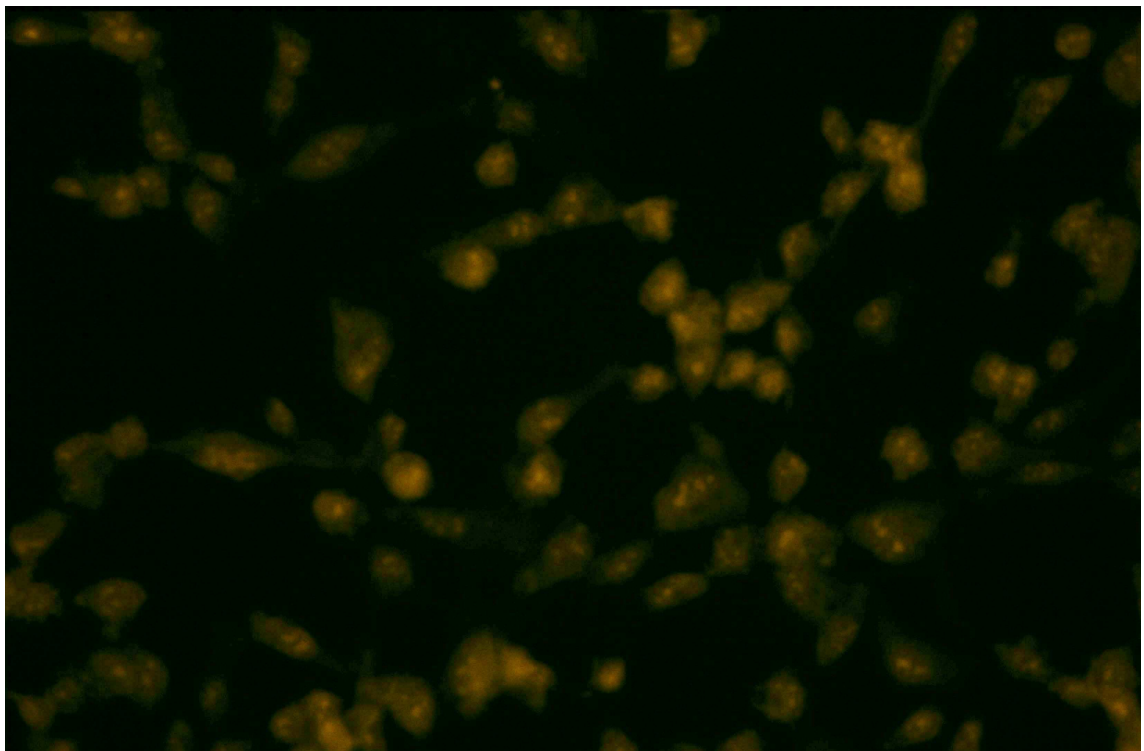
Weiter wurden die Zellen durch die immunzytochemische Färbung mit einem Anti- $\alpha$ -Smooth-Muscle-Aktin Antikörper, der direkt mit FITC konjugiert war, charakterisiert. Deutlich zu erkennen waren die mit Ethidiumbromid gegengefärbten Zellkerne und die langgestreckten Aktinfilamente. (Abbildung 3.5, 3.6).



**Abbildung 3.4** Bovine SMC, Phasenkontrast, Originalvergrößerung x25



**Abbildung 3.5** Bovine SMC, immunzytochemische Färbung mit Anti- $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin, FITC-konjugiert, Originalvergrößerung x25



**Abbildung 3.6** Bovine SMC, immunzytochemische Färbung mit Anti- $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin, FITC-konjugiert, Originalvergrößerung x50

### 3.2 Proliferationsassay mit 5% FCS im Kulturmedium

Nach 24 Stunden zeigte sich bei den SMC, die auf PDT-behandelter Matrix kultiviert wurden (PDT), mit 91% eine leichte, aber signifikante Verringerung des Wachstums gegenüber den Zellen auf unbehandelter ECM (KO) (siehe Tabelle 3.1).

Ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten die SMC, welche auf unbehandelten Zellkulturplatten (PL) wuchsen. In dieser Versuchsgruppe lag die Zellzahl mit 83% deutlich unter der der KO-Gruppe.

Die Behandlung mit Laserlicht oder mit dem PS allein hatte dagegen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der SMC. So lag die Zahl der Zellen, die auf CASPc-behandelter ECM wuchsen (DT) und auch die Zahl der Zellen, die auf Laser-bestrahlter ECM (KO) kultiviert wurden nahezu identisch zur KO-Gruppe. (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.7)

Nach 48 Stunden war die Zellzahl in der PDT-Gruppe mit 91% signifikant niedriger als in der KO-Gruppe. Auch das Wachstum der Zellen in der PL-Gruppe war nach 48 Stunden mit 67% noch weiter gehemmt. Wie schon nach 24 Stunden, war weder in der LO-Gruppe noch in der DT-Gruppe ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO festzustellen. (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.8)

Auch beim letzten Versuchszeitpunkt zeigte sich ein ähnliches Bild. Nach 72 Stunden lag die Zellzahl nach PDT-Behandlung mit 87% und die Zellzahl in der PL-Gruppe mit 76% deutlich unter der der KO-Gruppe.

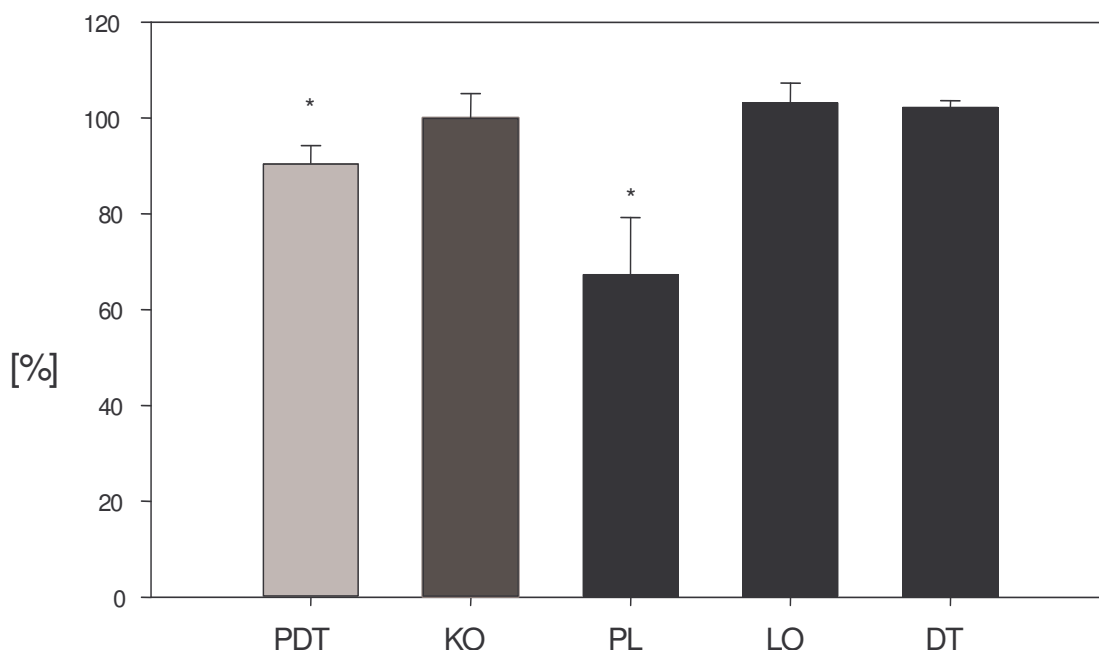
Alleinige Laserbestrahlung (LO) und die Behandlung mit CASPc (DT) zeigten auch nach 72 Stunden keinen Effekt auf die Proliferation der SMC (Tabelle 3.1, Abbildung 3.9).

Zeitpunkt	Gruppe	Anzahl n	Mittelwert %	Stabw. %	p vs. KO
24 Stunden	PDT	10	91	6,9	0,0016
	KO	12	100	4,2	-
	PL	12	83	4,7	0,0001
	LO	3	102	4,4	0,4329
	DT	3	96	3,1	0,1500
48 Stunden	PDT	10	91	3,7	0,0001
	KO	11	100	5,1	-
	PL	10	67	11,8	0,0001
	LO	3	103	4,0	0,3366
	DT	3	102	1,3	0,4579
72 Stunden	PDT	13	87	6,9	0,0001
	KO	17	100	4,4	-
	PL	15	76	7,3	0,0001
	LO	8	103	4,8	0,1033
	DT	6	101	8,2	0,8234

**Tabelle 3.1** Proliferation von SMC in % in Bezug auf KO

Proliferation von SMC nach 24, 48 und 72 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden. Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 5%.

Angegeben sind die Versuchsanzahl (n), die Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabw.) in Bezug auf KO in % sowie die statistischen Unterschiede (p) mit ANOVA versus KO (p vs. KO). Statistiken beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.



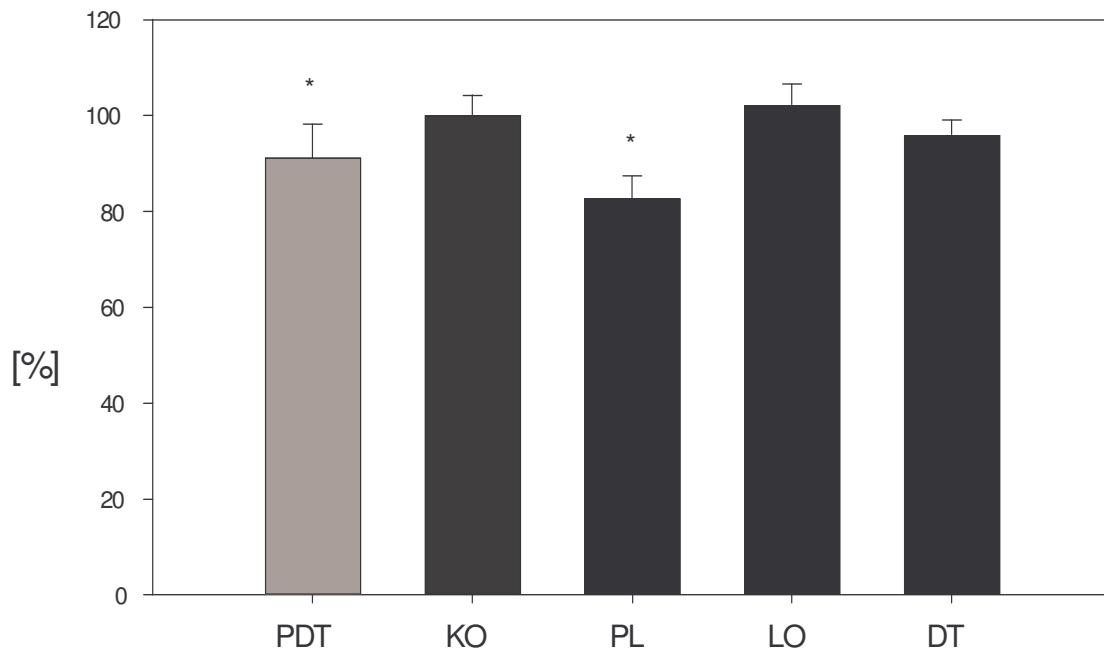
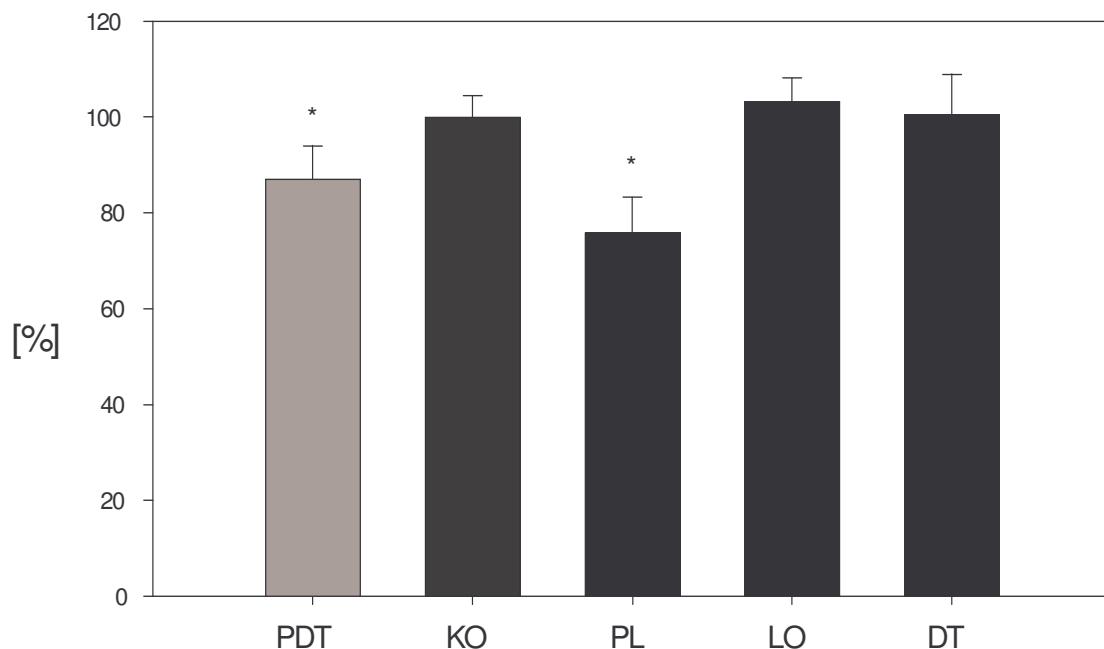
**Abbildung 3.7** SMC Proliferation nach 24 Stunden

Proliferation von SMC nach 24 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden in Bezug auf KO.

Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 5%.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, angegeben in %.

\* markiert signifikante Unterschiede mit ANOVA  $p < 0,05$  versus KO. Signifikanzen beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.

**Abbildung 3.8 SMC Proliferation 48 Stunden****Abbildung 3.9 SMC Proliferation 72 Stunden****Abbildung 3.8 und 3.9**

Proliferation von SMC nach 48 Stunden und 72 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden in Bezug auf KO.

Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 5%.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, angegeben in %.

\* markiert signifikante Unterschiede mit ANOVA  $p < 0,05$  versus KO. Signifikanzen beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.



### 3.3 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Der Proteingehalt der Zellen innerhalb der einzelnen Versuchsuntergruppen (PDT, KO, PL, DT, LO) wurde zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden) betrachtet und auf signifikante Unterschiede im Proteingehalt untersucht.

In den Proben von SMC, die auf PDT-behandelte ECM aufgebracht wurden (PDT), konnte zwischen 24 Stunden und 48 Stunden ein signifikanter Anstieg des Proteingehalts gemessen werden, wohingegen der Proteingehalt im weiteren Verlauf des Versuches nicht weiter zunahm (Tabelle 3.2, Abbildung 3.10).

Proben von SMC, die auf unbehandelter ECM (KO) kultiviert wurden, zeigten im Gegensatz dazu zu allen Zeitpunkten eine signifikante Zunahme des Proteingehalts.

SMC, die auf unbehandelten Zellkulturplatten kultiviert wurden (PL), zeigten während der gesamten Versuchsdauer kein signifikantes Wachstum. Der Gesamtproteingehalt blieb zu allen Zeitpunkten nahezu gleich (Tabelle 3.2, Abbildung 3.10).

Ein mit der KO-Gruppe vergleichbares Verhalten zeigten SMC, die auf CASPc-behandelter ECM wuchsen (DT). Auch hier konnte zu allen Zeitpunkten eine signifikante Zunahme des Gesamtproteins nachgewiesen werden (Tabelle 3.2, Abbildung 3.10).

Der Proteingehalt der Proben, bei denen SMC auf Laser-bestrahlter ECM kultiviert wurden (LO), war 24 Stunden und nach 48 Stunden mit dem der KO- und DT-Gruppe vergleichbar. Der Gesamtproteingehalt der Proben nahm signifikant zu. Im weiteren Verlauf dagegen stieg das Gesamtprotein nicht mehr signifikant an (Tabelle 3.2, Abbildung 3.10).

Wurden die einzelnen Versuchsgruppen in Bezug zu der KO-Gruppe gesetzt, zeigte sich schon nach 24 Stunden, dass die PDT-Behandlung der ECM einen signifikanten Einfluss auf den Proteingehalt der Proben hatte. So war der Proteingehalt der PDT-Proben mit nur 75% der KO-Werte deutlich erniedrigt. Einen noch größeren Unterschied ließ sich in der PL-Gruppe aufzeigen. Hier war der Proteingehalt auf 72% gesenkt.

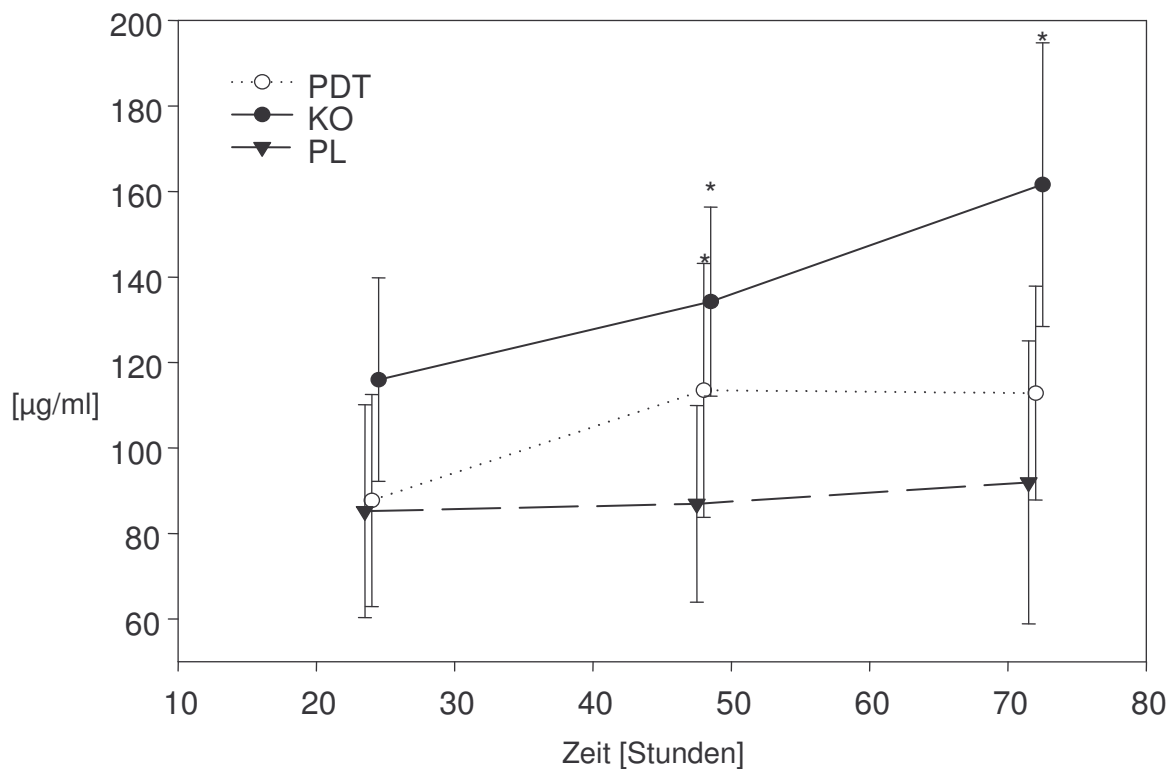
Dagegen war der Gesamtproteingehalt der LO-Gruppe und der der DT-Gruppe nicht signifikant verändert (Tabelle 3.3, Abbildung 3.11).



Gruppen	24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
	$\mu\text{g/ml}$		$\mu\text{g/ml}$		$\mu\text{g/ml}$	
		Anzahl n	p 24h vs 48h	Anzahl n	p 48h vs 72h	Anzahl n
PDT	88	24,8	113	29,7	113	24,97
		21	0,0054	18	0,9399	21
KO	116	23,8	134	22,1	162	33,2
		21	0,0152	20	0,0037	21
PL	85	24,9	87	23,0	92	33,1
		21	0,8143	20	0,5719	21
LO	108	22,0	132	36,7	143	32,2
		21	0,0144	17	0,2966	21
DT	101	28,6	133	30,2	155	23,5
		18	0,0010	20	0,0121	21

**Tabelle 3.2** SMC Gesamtproteingehalt

Gesamtprotein von SMC-Proben nach 24, 48 und 72 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-



**Abbildung 3.10** SMC Gesamtproteingehalt

Gesamtprotein von SMC-Proben nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden.

Der FCS-Gehalt im Medium betrug 0,5%. Werte sind angegeben in  $\mu\text{g/ml}$ .

\* markiert signifikante Unterschiede mit ANOVA  $p < 0,05$ : 24 Stunden versus 48 Stunden und 48 Stunden versus 72 Stunden. Signifikanzen beziehen sich immer auf dieselbe Gruppe.

Nach 48 Stunden zeigte sich ein ähnliches Bild. Mit 81% war der Proteingehalt der PDT-Gruppe deutlich verringert. Der Proteingehalt der PL-Proben war mit 64,1% noch stärker gesenkt. Wie schon nach 24 Stunden zeigte sich auch nach 48 Stunden weder durch die Laser-Bestrahlung (LO) noch durch die CASPc-Behandlung (DT) der ECM eine Veränderung des Proteingehalts der Proben. (Tabelle 3.3, Abbildung 3.12).

Auch nach 72 Stunden lag die Gesamtproteinmenge in der PDT-Gruppe mit 70,5% hoch signifikant unter der der KO-Gruppe. In den PL-Proben war sogar gerade noch halb so viel Protein enthalten wie in den entsprechenden Kontrollen.

Die Zellen der DT-Gruppe zeigten auch nach 72 Stunden keine signifikante Veränderung in Bezug auf die KO-Gruppe. Die Proteinexpression in der LO-Gruppe hatte nach 72 Stunden mit 89% gegenüber KO signifikant abgenommen (Tabelle 3.3, Abbildung 3.13).

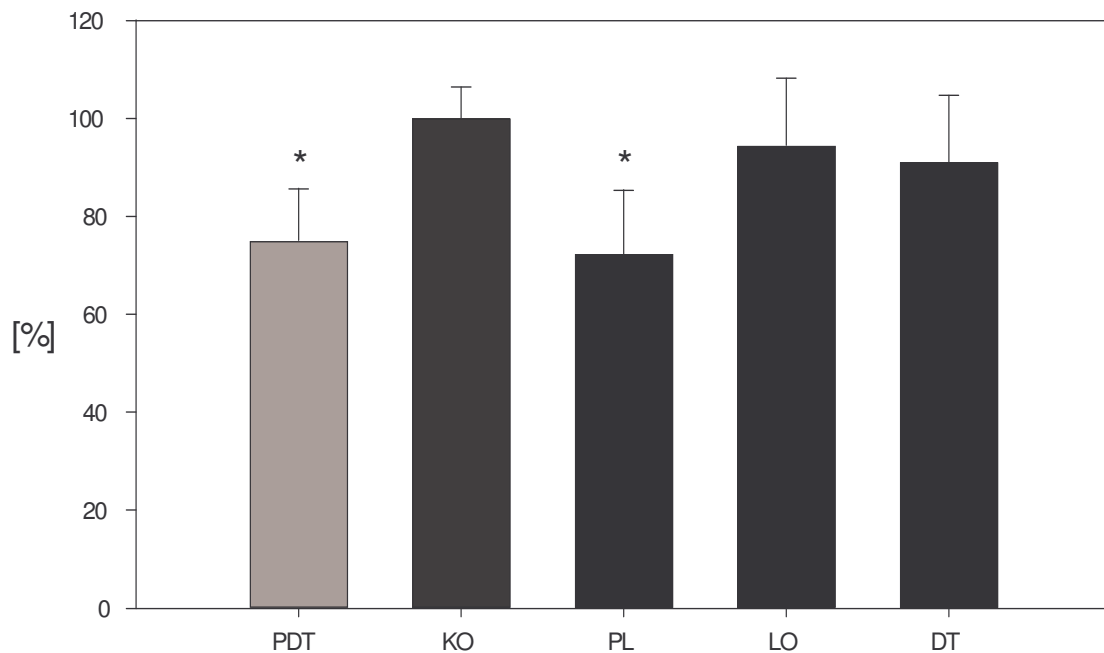
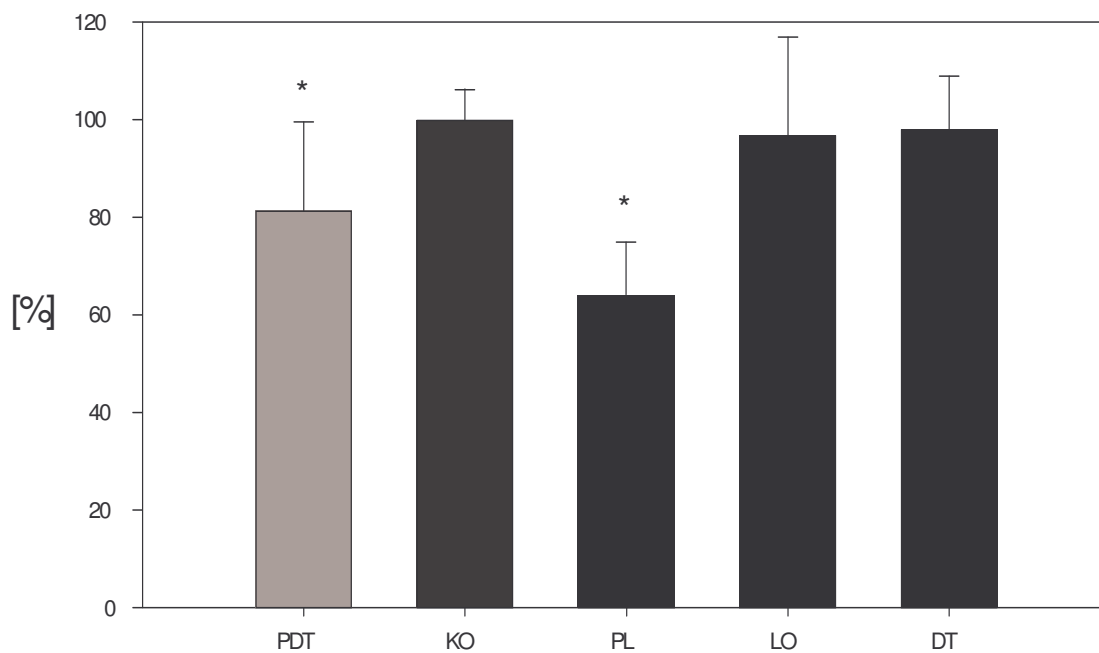
Verglichen mit der PDT- und PL-Gruppe lag der Proteingehalt der LO-Proben jedoch signifikant höher (ANOVA  $p=0,0008$  versus PDT, PL).

Zeitpunkt	Gruppe	Anzahl n	Mittelwert %	Stabw. %	p vs. KO
24 Stunden	PDT	21	75	10,6	0,000117
	KO	21	100	6,3	-
	PL	21	72	13,1	0,000117
	LO	21	94	13,8	0,540264
	DT	18	91	13,7	0,150466
48 Stunden	PDT	18	81	18,2	0,001139
	KO	20	100	6,2	-
	PL	20	64	10,8	0,000118
	LO	17	97	20,1	0,962404
	DT	20	98	10,9	0,991666
72 Stunden	PDT	21	70	11,5	0,000116
	KO	21	100	6,3	-
	PL	21	56	12,3	0,000116
	LO	21	89	12,4	0,025265
	DT	21	97	13,5	0,946515

**Tabelle 3.3** SMC-Gesamtproteingehalt in % in Bezug auf KO

Gesamtproteingehalt von SMC-Proben nach 24, 48 und 72 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden. Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 0,5%.

Angegeben sind die Versuchsanzahl (n), die Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabw.) in Bezug auf KO in % sowie die statistischen Unterschiede (p) mit ANOVA versus KO (p vs. KO). Statistiken beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.

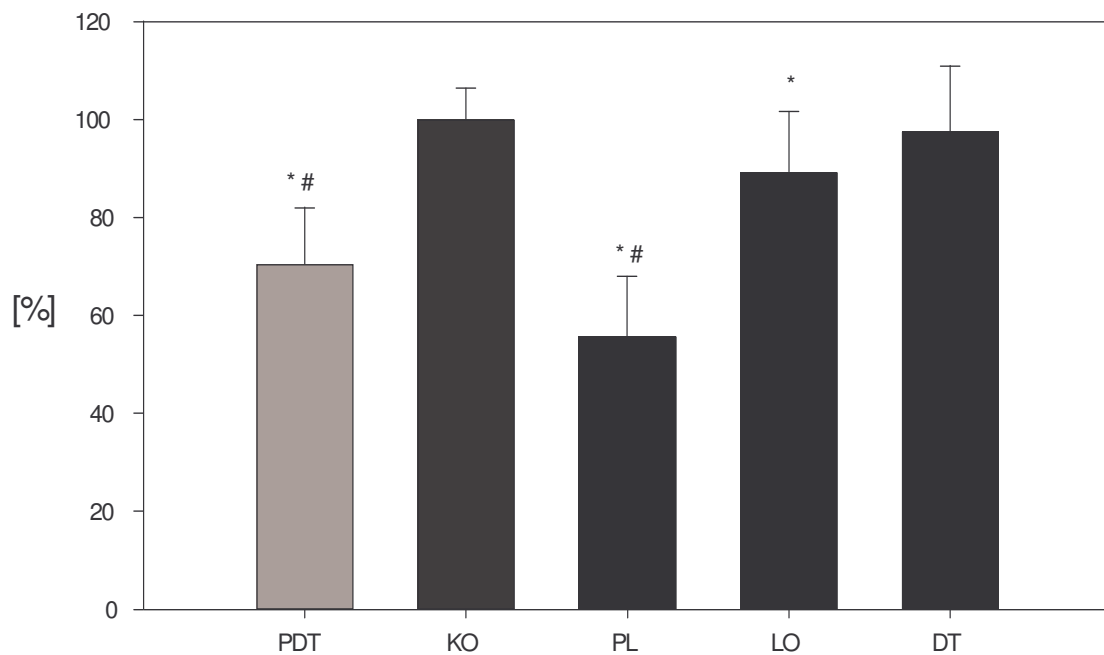
**Abbildung 3.11** SMC Gesamtproteingehalt 24 Stunden**Abbildung 3.12** SMC Gesamtproteingehalt 48 Stunden**Abbildung 3.11 und 3.12**

Gesamtproteingehalt von SMC-Proben nach 24 Stunden und 48 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden in Bezug auf KO.

Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 0,5%.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, angegeben in %.

\* markiert signifikante Unterschiede mit ANOVA  $p < 0,05$  versus KO. Signifikanzen beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.



**Abbildung 3.13 SMC Gesamtprotein 72 Stunden**

Gesamtproteingehalt von SMC-Proben nach 72 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-eingehalt von SMC-Proben nach 24 Stunden und 48 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und handelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden in Bezug auf KO. Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 0,5%.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, angegeben in %.

\* markiert signifikante Unterschiede mit ANOVA  $p < 0,05$  versus KO.

# markiert signifikante Unterschiede mit ANOVA  $p < 0,05$  versus LO.

Signifikanzen beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.

### 3.4 Bestimmung des intrazellulären bFGF-Gehalts

Der intrazelluläre bFGF-Gehalt der SMC der einzelnen Versuchsuntergruppen wurde in Bezug zu dem bFGF-Gehalt der KO-Gruppe gesetzt und auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die auf PDT-behandelter ECM kultiviert wurden (PDT), nach 24 Stunden mit einem signifikanten Anstieg des intrazellulären bFGF-Gehalts auf 141% des KO-Gehalts reagierten. Daneben zeigte sich auch in Zellen der DT-Gruppe mit 147% ein deutlicher Anstieg gegenüber KO.

Im Gegensatz dazu ließ sich in den Zellen, die in unbehandelten Zellkulturplatten (PL) sowie in Laser-behandelter ECM (LO) wuchsen, kein signifikant veränderter bFGF-Gehalt nachweisen (Tabelle 3.4 und Abbildung 3.14).

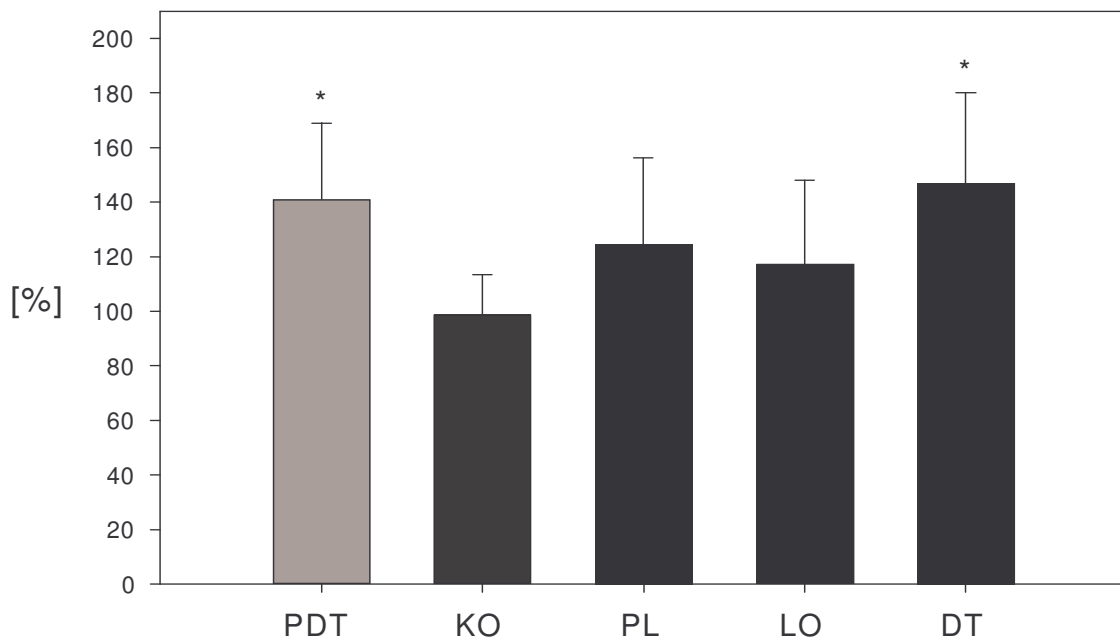
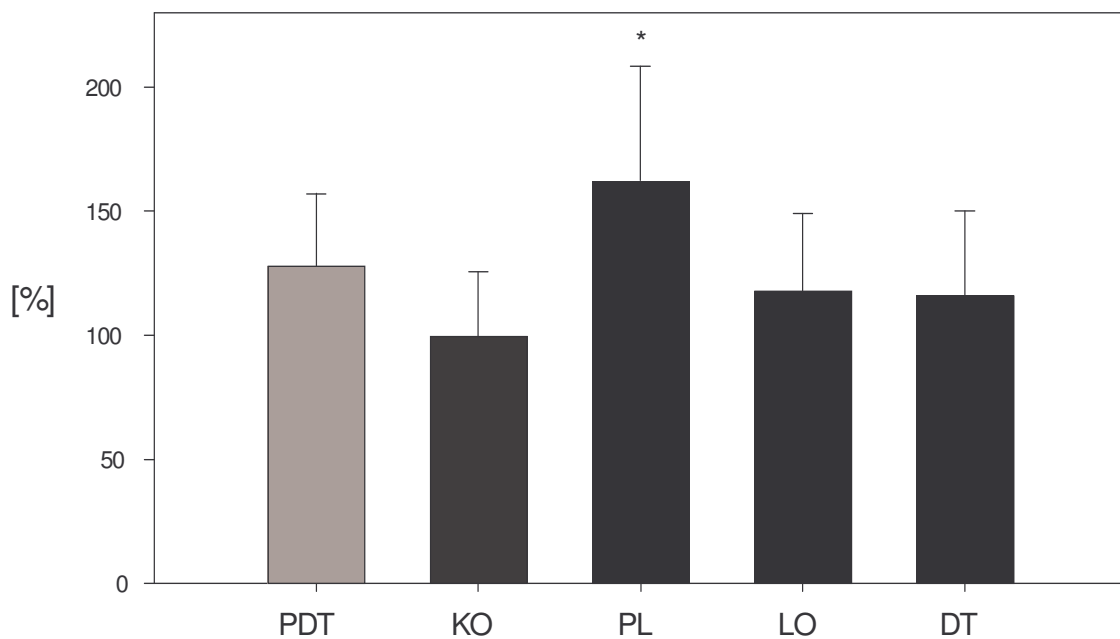
Zum Versuchszeitpunkt 48 Stunden war der bFGF-Gehalt der PDT-Gruppe nicht mehr signifikant erhöht. Während in den Zellen der PL-Gruppe nach 24 Stunden noch keine signifikante Änderung des bFGF-Gehalts nachgewiesen wurde, konnte nach 48 Stunden ein deutlicher Anstieg des bFGF auf 162% der KO-Gruppe festgestellt werden.

Der bFGF-Gehalt der LO-Gruppe war nahezu identisch mit dem der KO-Gruppe. Auch die Werte der DT-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant von der KO-Gruppe (Tabelle 3.4 und Abbildung 3.15).

Nach 72 Stunden konnte in den Zellen, die auf PDT-behandelter ECM gewachsen waren, kein signifikanter Unterschied zu Zellen der KO-Gruppe im bFGF-Gehalt mehr festgestellt werden.

Signifikant erhöht war hingegen der bFGF-Gehalt in den Zellen der PL-Gruppe. Er lag 26% über dem der KO-Proben.

Wie schon nach 48 Stunden zeigte weder die LO-Gruppe noch die DT-Gruppe einen signifikanten Unterschied zur KO-Gruppe (Tabelle 3.4, Abbildung 3.16).

**Abbildung 3.14** SMC intrazellulärer bFGF-Gehalt 24 Stunden**Abbildung 3.15** SMC intrazellulärer bFGF-Gehalt 48 Stunden**Abbildung 3.14 und 3.15**

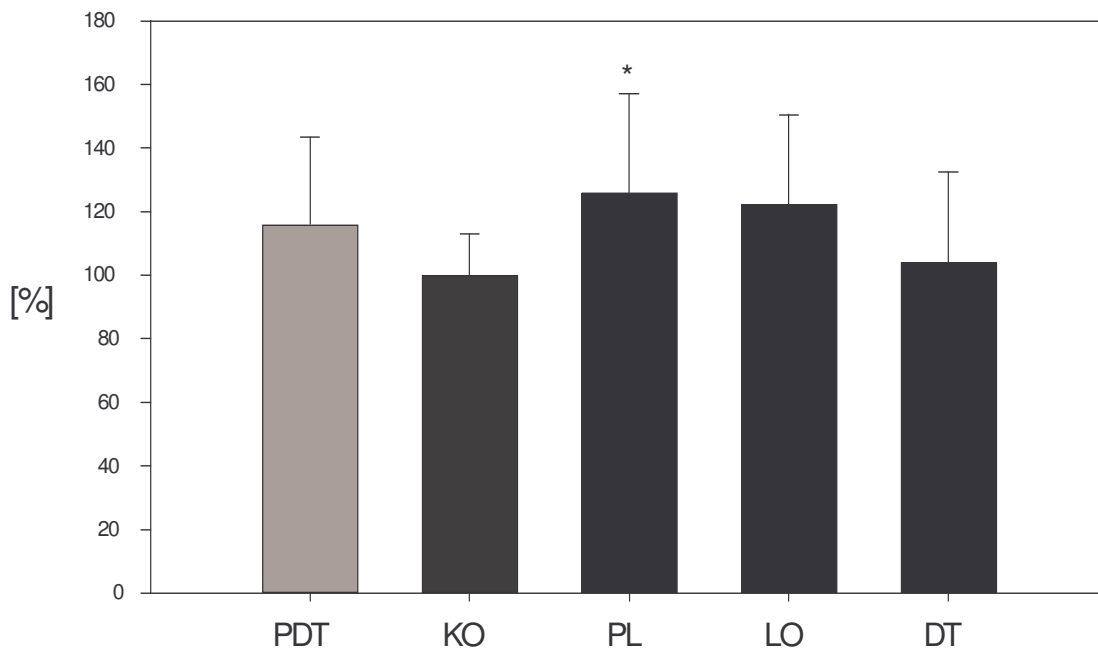
Intrazellulärer bFGF-Gehalt von SMC-Proben nach 24 Stunden und 48 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden in Bezug auf KO.

Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 0,5%.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, angegeben in %.

\* markiert signifikante Unterschiede ANOVA  $p < 0,05$  versus KO.

Signifikanzen beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.



**Abbildung 3.16** SMC intrazellulärer bFGF-Gehalt 72 Stunden

Intrazellulärer bFGF Gehalt von SMC-Proben nach 72 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden in Bezug auf KO. Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 0,5%.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, angegeben in %.

\* markiert signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  versus KO. Signifikanzen beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.

Zeitpunkt	Gruppe	Anzahl n	Mittelwert %	Stabw. %	p vs. KO
24 Stunden	PDT	14	141	28,5	0,0040
	KO	16	99	14,6	-
	PL	16	125	31,5	0,2391
	LO	18	117	30,7	0,5696
	DT	15	147	33,7	0,0004
48 Stunden	PDT	14	128	29,7	0,0500
	KO	15	100	25,6	-
	PL	15	162	46,2	0,0003
	LO	14	118	31,1	0,9013
	DT	14	116	34,1	0,7770
72 Stunden	PDT	20	116	27,4	0,4981
	KO	20	100	13,0	-
	PL	18	126	31,5	0,0300
	LO	21	122	28,1	0,3887
	DT	20	104	28,4	0,9698

**Tabelle 3.5** bFGF-Gehalt in % in Bezug auf KO

Intrazellulärer bFGF Gehalt von SMC-Proben nach 72 Stunden, die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden in Bezug auf KO. Der FCS-Gehalt im Kulturmedium betrug 0,5%.

Angegeben sind die Versuchsanzahl (n), die Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabw.) in Bezug auf KO in % sowie die statistischen Unterschiede (p) mit ANOVA versus KO (p vs. KO). Statistiken beziehen sich immer auf denselben Zeitpunkt.

## Zusammenfassung der Ergebnisse

<i>Methodik</i>	<i>Gruppe</i>	<i>24 Std.</i>	<i>48 Std.</i>	<i>72 Std.</i>
<b>bFGF-Protein Expression</b>	KO	=	=	=
	PDT	↑	=	=
	PL	(↑)	↑	↑
	LO	=	=	=
	DT	↑	=	=
<b>Proliferation</b>	KO	=	=	=
	PDT	↓	↓	↓
	PL	↓	↓↓	↓
	LO	=	=	=
	DT	=	=	=

**Tabelle 3.6**

Zusammenfassung der verschiedenen Befundänderungen von SMC die auf unbehandelter ECM (KO), PDT-behandelter ECM (PDT), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPc-behandelter ECM (DT) und auf Plastik-Zellkulturplatten (PL) kultiviert wurden in Bezug auf KO zum jeweiligen Zeitpunkt.; (=) keine Veränderung; (↑)= starke Zunahme; (↓)= starke Abnahme; ↑= leichte Zunahme ; (↓)= leichte Abnahme; (↑)= tendenzielle Zunahme



## **4 Diskussion**

### **4.1 Problematik**

Die erfolgreiche Behandlung von obstruierenden Gefäßerkrankungen mittels chirurgischer oder interventioneller Eingriffe wird durch die Entstehung von Restenosen begrenzt (79).

Bei allen Behandlungsmodalitäten stellt der Eingriff an der Gefäßwand ein Trauma dar, das eine überschüssige Heilungsantwort auslöst (76). Dass es bislang nicht gelungen ist, die Entstehung von Restenosen erfolgreich und dauerhaft zu verhindern, liegt an dem komplexen Zusammenwirken verschiedener Faktoren wie Gefäßspasmen, Thrombosen oder Gefäßdissektionen (163), sowie dem Auftreten von Intimahyperplasie und Gefäßremodeling (10), die zu einem Wiederverschluss des behandelten Gefäßes führen können. Das gleichzeitige Vorhandensein von Wachstumsstimulatoren, wie z.B. bFGF und PDGF, sowie Inhibitoren, wie z.B. TGF $\beta$ , lässt dabei sowohl auf eine Redundanz der einzelnen Systeme als auch auf additive Wirkungsweisen der Faktoren schließen (156).

Rückblickend führten bislang alle Behandlungsstrategien, die in ihrer Wirkung nur auf einzelne Faktoren oder Mechanismen zielten, im klinischen Einsatz nicht zum Ziel, obwohl experimentelle Daten zunächst auf die Wirksamkeit hingedeutet hatten (10). So hatte der Einsatz von ACE-Hemmern wie Cilazapril (44), Lipidsenkern wie Lovastatin (164), Antikoagulantien wie Heparin (128) oder Hirudin (67), zytotoxischen Medikamenten wie Colchicin (114), sowie Wachstumsfaktor-Inhibitoren wie Angiopeptin (41) keinen Nutzen zur Prävention von Restenosen. Aus diesem Grund stellen neue Behandlungsmethoden wie PDT, welche multiple Wachstumsfaktoren, Inhibitoren, Hormone und Matrixbeschaffenheiten als Angriffsziel haben, eine interessante Alternative dar.

### **4.2 Photodynamische Therapie**

PDT an der Gefäßwand ist eine neue Behandlungsstrategie, die im Tierversuch das Auftreten von Stenosen nach vaskulären Eingriffen verhindert hat (88). Erste Studien

lassen auch auf die klinische Wirksamkeit von PDT zur Prävention von Restenosen nach Angioplastie hoffen (133).

PDT an der Gefäßwand führt zu einer lokalen Zerstörung der Gefäßwandzellen. Die Eliminierung von SMC wurde dabei als primäre Wirkung von PDT angesehen, da SMC, die nach Verletzung in die Intima migrieren, dort proliferieren und große Mengen von extrazellulärer Matrix synthetisieren und ablagern, wichtige Effektorzellen der IH darstellen (74, 121). Der Eradikation der vaskulären Zellen durch PDT folgt die Reendothelialisierung und die adventitielle Repopulation, ohne dass SMC in die Intima einwachsen und sich stenosierende Läsionen ausbilden (88).

Es erscheint paradox, dass PDT durch Bildung freier Radikale Zellschäden verursacht und so erfolgreich IH verhindert, die nach Gefäßwandverletzung durch chirurgische oder interventionelle Eingriffe entstanden ist. Dabei kommt es nicht zu einer Proliferations- oder Entzündungsantwort wie sie bei Gefäßwandverletzungen durch chirurgische oder interventionelle Eingriffe zu beobachten sind.

Obwohl PDT-behandelte Arterien im untersuchten Zeitraum keine wesentlichen Gefäßverengungen oder Gefäßerweiterungen aufzeigten, was für die Erhaltung der strukturellen Integrität des behandelten Gefäßes spricht (123), deuten verschiedene histologische Befunde auf eine funktionelle Änderung der extrazellulären Umgebung hin:

1. Nach PDT an Gefäßen kommt es zu keiner Besiedlung der Media nach 4 Monaten, wohingegen eine Reendothelialisierung schon nach 2 Wochen nachzuweisen ist (88).
2. Es zeigen sich Zelltrümmer in der Gefäßwand, die auf die PDT-induzierte Toxizität zurückzuführen sind (123), aber keine Thrombose oder entzündliche Reaktionen (74, 88).
3. Am Übergang zwischen unbehandelten und PDT-behandelten Segmenten, wo vitale EC, SMC und Fibroblasten verbleiben, zeigen SMC keine gesteigerte Proliferation und Migration (151).
4. Obwohl die durch PDT-induzierte Zytotoxizität zu einer vollständigen Zellvernichtung führt, konnte keine Aneurysmabildung in-vivo beobachtet werden (88).
5. Bei einem Teil der Zellen im PDT-behandelten Gebiet wird der Zelltod durch Apoptose ausgelöst (90). Bei der Apoptose schrumpfen die Zellen, verlieren ihre interzellulären Kontakte und entwickeln sich zu Apoptosekörperchen, die durch benachbarte Zellen, wie z.B. Makrophagen, phagozytiert werden. Intrazelluläre Inhalte

wie z.B. Wachstumsfaktoren gelangen dabei nicht in die extrazelluläre Matrix, und es findet keine Inflammation statt (73).

Entscheidend für die Prävention von IH durch PDT ist eine exakte Dosimetrie (3, 74). PDT mit subtherapeutischer oder mit überhöhter Bestrahlungsenergie ist dabei mit Verletzungen durch chirurgische oder interventionelle Eingriffe vergleichbar. Diese führen über Mechanismen wie Thrombose, IH und GR zur Entwicklung einer Restenose und zum Gefäßverschluss. So konnte gezeigt werden, dass es in Arterien, die mit einer subtherapeutischen PDT-Dosis behandelt wurden, zwar zu einer vollständigen Vernichtung der SMC kommt, sich aber mit Verzögerung doch IH ausbildete (3, 123). PDT mit einer überhöhten Bestrahlungsenergie führte dagegen innerhalb von 24 Stunden nach Behandlung zu Thrombusbildung und Gefäßverschluss (3).

Diese histologischen Erkenntnisse nach therapeutischen Dosen von PDT in experimentellen IH-Modellen führen zu der Überlegung, dass PDT nicht nur Zellschädigung bewirkt, sondern auch multiple Wachstumsfaktoren, Inhibitoren, Hormone und Strukturen der ECM als Angriffsziel hat (2).

Ähnlich wie eine Reihe von vorangegangenen in-vitro Studien (2, 87, 147-151), baut die vorliegende Untersuchung auf der Hypothese auf, dass die Wirkung von PDT nicht allein durch die PDT-induzierte Zytotoxizität vermittelt wird. Ziel dieser Studie ist es, die Mechanismen, die nach einer PDT-Behandlung ablaufen, besser zu verstehen, um so den Einzug von PDT in den klinischen Alltag zu ermöglichen.

#### **4.3 Basic Fibroblast Growth Factor**

Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF; FGF-2) gehört zu einer Gruppe von zur Zeit 23 bekannten, strukturell miteinander verwandten Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (29, 120). Die im Zytoplasma gespeicherte und sezernierte Form von bFGF ist ein 18kDa großes, aus 155 Aminosäuren bestehendes, nicht-glykosyliertes Polypeptid, welches sowohl inter- als auch extrazelluläre Aktivität zeigt (36, 49). Daneben sind noch weitere Formen von bFGF mit höherem Molekulargewicht zwischen 22kDa und 34kDa im Zellkern nachgewiesen worden, welche sich in ihrer Funktion nicht vom 18kDa bFGF unterscheiden (6, 14). Das Vorkommen von bFGF im Gewebe ist ubiquitär. So konnte es unter anderem in viszeralen und vaskulären SMC, EC (29), Thrombozyten (105), Fibroblasten und in der ECM (5) nachgewiesen werden.

Die Wirkung von bFGF ist vielfältig. So spielt bFGF unter anderem in der Angiogenese (57) und der Tumorgenese (55) eine große Rolle. Außerdem besitzt bFGF große mitogene Aktivität sowohl für EC als auch für SMC (28, 166).

Die vorgelegten Untersuchungen konzentrieren sich auf bFGF, da es ein etablierter, biologisch wichtiger Wachstumsfaktor ist, welcher eine große Rolle bei der Entstehung von IH und bei dem Auftreten von Restenosen spielt (115).

Berücksichtigt man, dass bFGF als „Wundhormon“ fungiert (61), welches Gewebeheilung nach Verletzung initiiert, kann man darauf schließen, dass bFGF auch ein wichtiger Mediator bei der proliferativen Reaktion der SMC nach Gefäßverletzung ist, indem er die SMC Proliferation nach Verletzung mitverursacht (98, 131). Verletzungen der Gefäßwand durch Ballonangioplastie aber auch Schäden durch Hitze einwirkung (38), Stentimplantation (8) oder durch Gammabestrahlung (70) gehen mit weitreichender Zellvernichtung einher, die in einer gesteigerten SMC Proliferationsantwort resultiert. Es wurde gezeigt, dass mechanisch verletzte EC und SMC bFGF ausschütten, welches an der ECM bindet und einen langanhaltenden Proliferationsstimulus für SMC darstellt (50). Dabei zeigte sich auch, dass das Ausmaß der SMC-Proliferation und die folgende intimale Neubildung proportional zum Grad der Gefäßschädigung ist (47, 75). Dass bFGF in dieser Reaktion auf die Verletzung der Gefäßwand eine große Rolle spielt, konnte durch die Beobachtung belegt werden, dass SMC-Proliferation durch anti-bFGF-Antikörper gehemmt (101) und neointimale Hyperplasie nach Ballonangioplastie unterdrückt werden konnten (118).

Neben der Tatsache, dass bFGF aus geschädigten oder zerstörten Zellen freigesetzt wird, konnte gezeigt werden, dass es auch in monomerer Form sezerniert wird (42). Über den genauen Sekretionsmechanismus für bFGF ist bislang nicht viel bekannt. Sicher ist, dass bFGF keine hydrophobe Signalsequenz für die sekretorische Ausschleusung über das endoplasmatische Retikulum (ER) - Golgi - System besitzt (1, 108). Es konnte aber gezeigt werden, dass die 18kDa Form von bFGF über eine Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige, vom ER-Golgi-System unabhängige, Exozytose von Zellen sezerniert wird (49, 170).

Im Rahmen der Entwicklung von Restenosen nach Gefäßverletzung könnte die Möglichkeit der aktiven Sekretion von autokrinen Wachstumsfaktoren wie bFGF eine bedeutende Rolle spielen (152). Studien belegten, dass sich Zellen durch die Exozytose von bFGF autokrin stimulieren können (107). Es konnte weiter gezeigt werden, dass

arterielle SMC, die aus neointimalem Gewebe kultiviert wurden, vermehrt bFGF synthetisieren und ihre Proliferation eventuell autokrin stimulieren (97).

Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass durch PDT sowohl matrixassoziiertes bFGF (87) als auch zellassoziiertes bFGF (147) eliminiert werden. Auch konnte gezeigt werden, dass bei der direkten Zerstörung von Zellen mittels PDT kein bFGF freigesetzt wird (70).

Diese Studie untersucht erstmalig den intrazellulären bFGF-Gehalt von vitalen, nicht PDT-behandelten SMC die jedoch auf PDT-behandelter Matrix kultiviert wurden. Diese Zellen sollen neu-einwachsende SMC simulieren, die die Arterienwand nach der vollständigen Zelleradikation durch PDT wiederbesiedeln.

## **4.4 Experimenteller Aufbau**

### **4.4.1 Photosensitizer**

Ein etablierter und von der U.S. Food and Drug Administration für klinische PDT zugelassene PS ist Photofrin II (PF) (122). PF, ein PS der ersten Generation, gehört zur Gruppe der Hematoporphyrinderivate (HpD) und besteht aus einem komplexen Gemisch aus Porphyrinmonomeren und Oligomeren, die sich von Hematoporphyrin ableiten (122). Auch im Rahmen der vaskulären PDT zur Bekämpfung von IH wurde PF im Tierversuch erfolgreich evaluiert (43). Trotz der nachgewiesenen Wirksamkeit und des breiten Einsatzes von PF, sind die Eigenschaften dieses PS nicht ideal (122). So ist die komplexe chemische Struktur nicht genau definiert und es herrscht Uneinigkeit darüber, was die eigentlich aktive Komponente ist (12). Auch sind die schwache Lichtabsorption (molarer Extinktionskoeffizient  $[\epsilon] = 3.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) mit Licht der Wellenlänge 630nm sowie die Tendenz sich in der Haut zu akkumulieren, ungünstige Eigenschaften (122).

Der für die vorliegenden Untersuchungen gewählte PS CASPc wurde in den letzten Jahren in zahlreichen in-vivo und in-vitro Untersuchungen verwendet, um die zugrunde liegenden Mechanismen von PDT zur Verhinderung von Restenosen aufzuklären (2, 70, 87-90, 123, 147-151). Damit ist CASPc einer der am besten charakterisierten PS auf dem Gebiet der vaskulären PDT, obwohl er für den klinischen Einsatz bislang nicht zugelassen ist. Das Metallo-Phthalocyanin CASPc, gehört zur zweiten Generation der PS, die im Vergleich zu PF klare Vorteile haben (122). So zeigten in-vitro Versuche mit CASPc eine geringere Toxizität ohne Lichtaktivierung (DT-Effekte) als bei HpD (132).

Dagegen wiesen in-vivo Studien auf eine größere lokale Zytotoxizität bei gleichzeitig geringeren systemischen Nebenwirkungen als bei PF hin (85). Ein weiterer Vorteil von CASPc ist die größere Penetrationstiefe des zu seiner Aktivierung benötigten Lichtes. Dabei ist die Penetrationstiefe von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes abhängig. Die effektive Penetrationstiefe  $\alpha$  ist dabei umgekehrt proportional zum effektiven Verdünnungskoeffizienten ( $\alpha=1/\epsilon$  Tiefe) (72). So wird bei dem Einsatz von PF mit 630nm (122) sowie 5-Aminolaevulinsäure mit 635nm (78) eine Penetrationstiefe von 1-3mm erreicht. Im Gegensatz dazu wird mit CASPc mit seiner Aktivierungswellenlänge von 675nm mit 2-6mm eine fast doppelt so tiefe Gewebspenetration erreicht (12). Aufgrund der klaren Vorteile der Metallo-Phthalocyanine wird der Einsatz von Antrin (Motexafin lutetium), einem weiteren Vertreter der Metallo-Phthalocyanine, für die vaskuläre PDT zur Zeit in klinischen Phase-II Studien evaluiert (133, 141). Antrin hat mit einer 742nm eine noch günstigere Aktivierungswellenlänge (133), was für den klinischen Einsatz im Bereich der vaskulären PDT von Vorteil ist.

#### 4.4.2 Zellen

Zur Durchführung der Versuche wurden bovine, aortale, EC und SMC verwendet. Das bovine System wurde gewählt, weil es sehr gut charakterisiert (60, 62, 66, 84) ist und in den vergangenen Jahren für zahlreiche Untersuchungen verwendet wurde, die die zugrunde liegenden Mechanismen von PDT zur Verhinderung von Restenosen aufklären sollten (2, 87, 88, 147, 148, 150, 151). Die für die Isolation benutzten Aorten konnten in ausreichender Menge wöchentlich vom örtlichen Schlachthof bezogen werden. Da die Zellen aus der Aorta isoliert wurden, spiegeln sie das für Restenosen relevante arterielle System wider. Die Handhabung der Zellen ist unkompliziert, da außer FCS keine weiteren Wachstumsfaktoren zugesetzt werden müssen (2). Die Zellen wurden ausschließlich von der zweiten bis fünften Passage verwendet, um die Entdifferenzierung der Zellen weitestgehend auszuschließen (2).

Aus verschiedenen Gründen wurde auf den Einsatz humaner Gefäßzellen verzichtet: Humane Gefäßzellen, die meist aus der Vena saphena magna isoliert werden, sind nur bedingt zu erhalten und benötigen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, um in Kultur gehalten zu werden. Die Zugabe von zusätzlichen Wachstumsfaktoren könnte das Wachstum und das Verhalten der zu untersuchenden Zellen auf der ECM beeinflussen. Außerdem ist das Infektionsrisiko, verglichen mit bovinen Zellen, erhöht und das biologische Verhalten je nach Spender unterschiedlich.

#### 4.4.3 Extrazellulärmatrix

Aufbau und Zusammensetzung der ECM können zu Veränderungen des Wachstums- und Syntheseverhaltens sowie der Differenzierung der Zellen führen (53, 134). Diese Eigenschaften können in signifikantem Maße die Ausbildung von IH und GR nach Gefäßverletzung beeinflussen (27, 52).

Zusätzlich zur strukturellen Beschaffenheit der ECM ist bekannt, dass ihre biologisch aktiven Komponenten wie PDGF, TGF $\beta$  oder bFGF eine große Rolle bei der fibroproliferativen Reaktion nach Gefäßverletzung spielen (45). So stellen unter anderem Wachstumsfaktoren wie PDGF (81) und bFGF (18) wichtige Mitogene für SMC dar.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, die ECM künstlich aus ihren Hauptbestandteilen Kollagen (Typ IV), Glykoproteine (Laminin, Fibronectin, Enkantin) und sauren Proteoglykanen (Heparansulfat) herzustellen (53). Die biologischen Verhältnisse werden aber mit einer Kombination aus einzelnen, isolierten Matrixkomponenten nur ungenügend widerspiegelt (53). Aufgrund der Schwierigkeit, den komplexen Aufbau der ECM künstlich herzustellen, wurde ECM isoliert, die von kultivierten EC synthetisiert wurde. Kultivierte EC synthetisieren eine ECM, die in ihrer Organisation und in ihrem makromolekularen Aufbau dem natürlich vorkommenden Subendothelium ähnelt (84). Diese ECM fungiert nicht nur als strukturelle Stütze, sondern sie reguliert Anhaftungsverhalten, Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen (134). Die Effekte, die ECM auf das Verhalten der Zellen hat sind unter anderem mit der natürlichen Zusammensetzung und der dreidimensionalen Struktur zu begründen, die den Zellen eine bessere Formadaptation und eine schnellere Reaktion auf Hormone und Wachstumsfaktoren ermöglichen (159).

Die Arbeitsgruppe von Adili konnte die Möglichkeit ausschließen, dass PDT die ECM in den Zellkulturschalen zerstört, was die Ähnlichkeit zwischen PDT und PL erklären würde. Dafür wurden immunhistochemische Färbungen und elektronenmikroskopische Untersuchungen der ECM, vor und nach PDT, durchgeführt. Dabei zeigten sich keine Unterschiede, was den Schluss zulässt, dass vor und nach PDT strukturell vergleichbare ECM vorhanden waren (2).

Nachteil des verwendeten Verfahrens zur Herstellung der ECM ist, dass die Zusammensetzung der einzelnen Matrices nicht immer ganz identisch ist. Um diese natürlichen Schwankungen auszugleichen, wurde eine größere Zahl an Experimenten



durchgeführt. Entscheidender Vorteil ist aber, dass diese ECM das multiredundante System der in-vivo Situation am ehesten widerspiegelt.

#### **4.4.4 Versuchszeitpunkte**

Als Versuchszeitraum der vorliegenden Untersuchung wurden die ersten 72 Stunden nach PDT gewählt, um die Kurzzeiteffekte und deren zeitliche Kinetik zu zeigen. Die Proliferationsrate der SMC erhöhte sich im Tierexperiment von etwa 1% auf über 20% innerhalb der ersten 48 Stunden nach Gefäßverletzung (21, 25, 69). Die Gen-Induktion für wichtige Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF $\beta$  und bFGF, setzt etwa 12h nach Verletzung der Gefäßwand ein (68, 153). Die Proliferation der SMC wird hierbei maßgeblich durch den Wachstumsfaktor bFGF gesteuert (98, 99). Nach Ballonverletzung von Kaninchen-Aorten konnte mittels intravenöser Gabe von polyclonalen anti-bFGF Antikörpern in den ersten fünf Tagen nach Verletzung die Ausbildung von IH signifikant gehemmt werden (118). Auch der Einsatz von polyclonalen anti-bFGF Antikörpern in den ersten zwei Tagen nach abdominalen Aortenprothesen-Implantation in Ratten konnte die Proliferation von SMC signifikant hemmen (129). Die proliferationssteigernde Wirkung von bFGF ist demnach in den ersten 48 Stunden besonders relevant. Eine günstige Modulation der Zellfunktionen, bzw. des intrazellulären bFGF durch PDT der ECM könnte die Entstehung von IH begrenzen.

#### **4.4.5 Proliferationsassay**

In einer früheren in-vitro Studie wurde gezeigt, dass der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in SMC 24 Stunden nach PDT von ECM signifikant verringert ist (2). Die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation spiegelt die DNA-Replikation und damit den Energieumsatz innerhalb der Zelle wider. Aus der verringerten DNA-Replikation wurde indirekt auf eine verringerte Proliferationsrate der SMC geschlossen (2). Die genaue Zahl der Zellen wird mit dieser Methode nicht bestimmt, denn ein erniedrigter Energieumsatz muss nicht zwangsläufig mit einer verringerten Proliferation einhergehen. Gerade die genaue Aussage über die Proliferation und die Zellzahl der SMC ist im Zusammenhang mit der IH aber von großer Bedeutung, da die überschießende Zellvermehrung der SMC ein Schlüsselereignis bei der Entstehung von IH darstellt (32). Zum erstenmal wurde der



Effekt von PDT der ECM auf die Zellzahl der SMC und deren zeitlicher Verlauf innerhalb von 72 Stunden untersucht.

#### **4.4.6 Bestimmung des Gesamtproteingehalts**

Bei der Bestimmung des Gesamtproteins wurde der Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) verwendet. Dieser, auf der Methode von Bradford basierende Assay (13), ist seit langem etabliert und standardisiert. Ein Vorteil dieses Tests ist, dass er mit einem geringen Probenvolumen von 15µl/Messung auskommt, was dem geringen Probenvolumen im Versuchsaufbau zu Gute kommt. Der Test ist mit einer Nachweisgrenze von ca. 1µg/Probe ausreichend empfindlich, um auch geringe Proteinmengen korrekt zu bestimmen (Angabe des Herstellers).

Bei dem zu messenden Gesamtprotein handelt es sich um ein Gemisch aus einer Vielzahl von Proteinen. In Anlehnung an die Arbeit von Pollard wurde daher als Proteinstandard bovines Albumin (Standard II, BSA, Bio-Rad, München) verwendet, für welches die besten Ergebnisse zur Bestimmung von komplexen Proteingemischen gezeigt werden konnte (127).

Aus den gemessenen Gesamtproteindaten konnte indirekt ein Rückschluss auf die Menge des eingesetzten Zellmaterials und damit auf die Anzahl der lysierten Zellen geschlossen werden (33, 169). In einer Verdünnungsreihe wurde die Proportionalität zwischen Zellzahl und Proteingehalt der Probe überprüft. Es konnte somit auf die exakte Bestimmung der Zellzahl im CCA in den einzelnen Versuchsgruppen verzichtet werden. Anders als beim Proliferationsassay wurden nicht alle Zellen für die Zellzahlbestimmung eingesetzt, sondern für die weitere Bestimmung des intrazellulären bFGF-Gehalts verwendet. Deshalb war diese indirekte Methode notwendig.

#### **4.4.7 Bestimmung des intrazellulären bFGF-Gehalts**

Für die Bestimmung des intrazellulären bFGF-Gehalts wurde der schon in Vorarbeiten (147) verwendete Quantikine Human FGFbasic Immunoassay DFB50 (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet. Dieser ELISA ist standardisiert und mit einer Nachweisbarkeitsgrenze von <1pg/ml (Angabe des Herstellers) für die vorliegende Untersuchung empfindlich genug.

Der ELISA hat eine 100% Kreuzreaktion zu bovinem bFGF. Er zeigt dagegen nahezu keine Kreuzreaktivität zu anderen FGF-Formen (0,15% zu bovinem aFGF, 0,02% zu

rhFGF-4 , Angaben des Herstellers). Als Standard diente rekombinantes, humanes bFGF.

Wie der Proliferationsassay zeigte, war die Zahl der Zellen, die auf den verschiedenen behandelten Matrices kultiviert wurden, unterschiedlich. Um die Zellzahl zu berücksichtigen und so die gemessenen bFGF-Konzentrationen miteinander vergleichen zu können, wurde in diesem Versuchsaufbau der Gesamtproteingehalt der Proben vorher bestimmt (siehe 4.4.6). So wurde außerdem sichergestellt, dass das exakte Probenvolumen berücksichtigt und so Fehler in der Präparation der Proben eliminiert wurden.

#### 4.5 Diskussion der Ergebnisse

Photodynamische Therapie ist eine Behandlungsmodalität, die gleichzeitig auf mehreren Ebenen in die Mechanismen, die der Entstehung von Restenosen zugrunde liegen, eingreift:

Erstens eliminiert PDT die Effektorzellen der IH in der Gefäßwand und im umliegenden Gewebe durch die Induktion von Apoptose (90), ohne dass es zu einer entzündlichen Reaktion kommt (63). Darüber hinaus inaktiviert PDT zell-assoziiertes bFGF (147), zell-assoziiertes TGF $\beta$  (150), sowie zell-assoziiertes PDGF (151). Bei chirurgischen oder interventionellen Eingriffen verletzte (16, 20) oder mit ionisierenden Strahlen behandelte Zellen (70) dagegen schütten Wachstumsfaktoren wie bFGF und PDGF aus und steigern so die Proliferation von SMC.

Zweitens verursacht PDT strukturelle Veränderungen von Matrix-Proteinen wie z.B. Kollagen (124) und inaktiviert matrix-assoziierte Wachstumsfaktoren wie bFGF (87) und TGF $\beta$ <sub>1</sub> (150). Der Proliferationsassay zeigte, dass SMC, die auf PDT-behandelter ECM kultiviert wurden zu allen Zeitpunkten, eine - im Vergleich zu unbehandelter ECM - gehemmte Proliferation hatten. Dass die Proliferation über den gesamten Untersuchungszeitraum gehemmt blieb, lässt den Schluss zu, dass es sich bei den durch PDT hervorgerufenen Effekten um eine dauerhafte Änderung der extrazellulären Umgebung und nicht nur um einen kurzzeitigen Effekt handelt. Dies korrespondiert mit dem Auftreten einer dauerhaft zellfreien Media in-vivo (123). Die Abnahme der SMC-Proliferation nach PDT-Vorbehandlung der Matrix legt den Schluss nahe, dass durch die Inaktivierung des bFGF, bzw. weiterer matrix-assoziiierter Wachstumsfaktoren, bioaktive Stimuli für die SMC-Proliferation ausgeschaltet worden

sind. Und dies in relevanterem Maße als die Ausschaltung potentiell ebenfalls vorhandener natürlich vorkommender Inhibitoren.

Die Möglichkeit, das SMC-Wachstum auf PDT-behandelter ECM durch Zugabe von bFGF wieder anzuregen, unterstreicht die Bedeutung des PDT-Effekts auf Komponenten der ECM wie den Wachstumsfaktor bFGF (87). Der niedrige bFGF-Gehalt in der ECM nach PDT kann dabei nicht als Änderung der Bindungsstellen interpretiert werden, die eine Extraktion von bFGF unmöglich macht. Die Tatsache, dass nach Zugabe von exogenem bFGF zu PDT-ECM bFGF wieder gebunden wird, zeigt nämlich, dass die Low-affinity Rezeptoren für bFGF (Heparansulfate) nicht geschädigt sondern unbesetzt und funktionstüchtig sind (87). Diese Ergebnisse implizieren, dass PDT zwar das bFGF nicht aber die Low-affinity Rezeptoren inaktiviert (87).

Der inhibitorische Effekt, den PDT der ECM auf SMC hat, zeigt sich jedoch nicht generell bei allen Zellen. So haben SMC und EC durchaus Unterschiede in der Modulation ihrer Funktion (2). Während SMC in ihrer Proliferation durch die alleinige Präsenz von ECM stimuliert werden, hat die ECM einen eher hemmenden Effekt auf EC (2). Durch PDT der ECM steigt die Proliferation der EC jedoch signifikant an (2). Diese Feststellung lässt sich mit der in-vivo Situation in Einklang bringen, die nach PDT mit einer schnellen Reendothelialisierung der Intima und dem Ausbleiben des Einwachsens von SMC einhergeht (88). TGF $\beta_1$  ist ein potenter Inhibitor für die Proliferation und Migration von EC (71). Die Freisetzung von TGF $\beta_1$  durch Thrombozyten und intimalen SMC nach Gefäßverletzung kann die EC-Regeneration verlangsamen (71). Da matrixgebundenes TGF $\beta_1$  durch PDT inhibiert wird, liegt der Schluss nahe, dass die Proliferation der EC durch die Neutralisation dieses wichtigen EC-Inhibitors gesteigert wird. Dass die Proliferation der SMC nach PDT ab- die der EC dagegen zunimmt, ist für die klinische Situation eine günstige Konstellation, scheint PDT doch die IH-verursachenden SMC zu hemmen und IH-hemmende EC zu stimulieren. Dies könnte für das postinterventionelle Remodeling von entscheidender Bedeutung sein.

Die Bestimmung des Gesamtproteins zeigte ein - im Vergleich zur KO-Gruppe - zu allen Zeitpunkten verringertes Gesamtprotein in der PDT-Gruppe. Wenn man davon ausgeht, dass man anhand des gemessenen Gesamtproteins indirekt einen Rückschluss auf die Anzahl der eingesetzten Zellen ziehen kann, bestätigen sich auch unter diesen Bedingungen die Ergebnisse des Proliferationsassays. War im Proliferationsassay mit

5% FCS im Kulturmedium in den einzelnen Versuchsuntergruppen zwischen den Versuchszeitpunkten eine signifikante Zunahme der Zellzahl zu beobachten, konnte bei den Zellen mit 0,5% FCS nur zwischen 24 Stunden und 48 Stunden eine Stimulation des Wachstums beobachtet werden.

SMC, die auf unbehandelten Plastik-Zellkulturplatten kultiviert wurden, zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Zellen auf PDT-behandelter ECM. Auch ihr Wachstum war zu allen Zeitpunkten signifikant gehemmt. In SMC der PL-Gruppe, die mit 0,5% FCS im Kulturmedium kultiviert wurden, zeigte sich keinerlei Zunahme des Gesamtproteins. Dies könnte also bedeuten, dass die Zellen zwar überlebten, aber keine Proliferation stattfand. Es ist bekannt, dass die ECM Wachstumsfaktoren wie PDGF (81) und bFGF (18) enthält, die wichtige Mitogene für SMC darstellen. Es war daher nicht überraschend, dass die Proliferation der SMC auf unbe behandelter ECM im Vergleich zu Plastik-Zellkulturplatte signifikant gesteigert war. Ein Vergleich der Daten des Proliferationsassays und der Gesamtproteinbestimmung könnte ein Indiz dafür sein, dass FCS im Kulturmedium Effekte der PDT teilweise überlagert. Die alleinige Laserbestrahlung der ECM (LO) und auch der Einsatz des PS ohne Bestrahlung (DT) beeinflussten das Wachstumsverhalten der SMC zu keinem Zeitpunkt signifikant. Da LO und DT keinen Effekt aufweisen und auch thermale Effekte bei der geringen Bestrahlungsenergie keine Rolle spielen können (87), lassen diese Daten darauf schließen, dass die Bildung von Radikalen durch PDT für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Für diese Annahme spricht darüber hinaus, dass Radikalfänger wie Natriumacetat bFGF vor der Wirkung von PDT schützen können (147).

Abgesehen von einer signifikanten Verringerung des Gesamtproteins in den LO-Proben nach 72 Stunden bestätigt die Gesamtproteinbestimmung die Ergebnisse des Proliferationsassays. Es ist bekannt, dass schon die alleinige Bestrahlung mit Laserlicht die Restenoserate verringern kann (34, 35). So konnte eine beschleunigte Reendothelialisierung und eine signifikante Verringerung der IH durch die Bestrahlung mit Laserlicht nach Einbringen von Stents in Koronargefäße beobachtet werden (35). Der zugrundeliegende Mechanismus ist bislang nicht genau bekannt (80). Es ist aber eine dosisabhängige ATP-Depletion nach der Bestrahlung mit Laserlicht beschrieben (102). Die Abwesenheit von Energie in Form von ATP in der ECM könnte der Grund für die verringerte SMC-Proliferation sein und die hier beobachteten Ergebnisse erklären.

Drittens zeigt die vorliegende Untersuchung erstmals intrazelluläre Veränderungen nach PDT der ECM. So reagierten SMC, die auf PDT-behandelter ECM kultiviert wurden, mit einem signifikanten Anstieg des intrazellulären bFGF-Gehalts nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden war dagegen kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar.

Nach Gefäßverletzung wird bFGF durch verletzte oder abgestorbene Zellen ausgeschüttet und steigert so die SMC-Proliferation (50, 62, 98, 131). Es ist weiter beschrieben, dass die Verletzung der Gefäßwand die Expression und Sekretion von Zytokinen durch ortständige Makrophagen und SMC stimuliert (96). Diese frühzeitige Synthese von Wachstumsfaktoren soll durch autokrine und parakrine Stimulation eine dauerhaft gesteigerte Proliferation der SMC verursachen (96). Darüber hinaus fand die Arbeitsgruppe von Lindner eine gesteigerte bFGF mRNA und Protein Expression in SMC, die 8 Tage nach Angioplastie aus neointimalem Gewebe isoliert wurden, während nach 6 Wochen isolierte Zellen keinen erhöhten bFGF Gehalt mehr aufwiesen (97). Die Arbeitsgruppe von Li (95) kultivierte SMC aus neointimalem Gewebe 15 Wochen nach Ballonangioplastie einer Kaninchenaorta. Sie fanden dabei eine gesteigerte Proliferationsrate im Vergleich zu SMC aus unbehandelten Aorten. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Sekretion von mitogenen Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF $\beta$  nachgewiesen werden, welche eine anhaltende autokrine Stimulation der SMC bewirkte. Im Gegensatz dazu war die bFGF Sekretion aber nicht gesteigert, sondern sogar signifikant verringert (95). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass SMC gerade in ersten Tagen nach Gefäßverletzung vermehrt bFGF synthetisieren und durch autokrine Stimulation eine gesteigerte Proliferation der SMC verursacht wird. Die Synthese von bFGF geht im Verlauf wieder zurück (95, 97), jedoch wurde dann eine gesteigerte Sekretion von anderen mitogenen Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF $\beta$  nachgewiesen (95).

Auch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen einen signifikanten Anstieg des intrazellulären bFGF-Gehalts in der PDT-Gruppe nach 24 Stunden, wohingegen nach 72 Stunden kein Unterschied mehr feststellbar war. Unter Berücksichtigung der deutlich erniedrigten Proliferationsrate im Vergleich zur KO-Gruppe lässt dies nur den Schluss zu, dass bFGF nicht, oder nur in wesentlich geringerem Maße als bei der KO-Gruppe aus der Zelle ausgeschleust oder außerhalb der Zelle genutzt werden konnte und eine autokrine Stimulation nur sehr begrenzt stattfand. Dennoch sprechen die vorliegenden Untersuchungsergebnisse dafür, dass eine autokrine Stimulation der SMC

auf PDT-behandelter ECM stattfand. Dies wird im Vergleich mit der PL-Gruppe deutlich. Auf unbehandeltem Zellkulturplastik wurde nämlich eine signifikant erhöhte bFGF Proteinexpression nachgewiesen, und das obwohl die Zellen noch weniger proliferierten als bei PDT. Unter den herrschenden Kulturbedingungen mit einer erniedrigten FCS-Menge im Medium, fand in der PL-Gruppe tatsächlich keine autokrine bFGF-Stimulation statt, obwohl die intrazelluläre bFGF Proteinmenge signifikant zugenommen hatte. Dieser Befund lässt sich nur dadurch erklären, dass vermehrt produziertes und in der Zelle befindliches bFGF die Zelle nicht verlassen und nicht biologisch aktiv werden konnte.

Die biologischen Funktionen von bFGF werden durch die Interaktion zwischen High-affinity Tyrosinkinaserzeptoren und Low-affinity Heparansulfatrezeptoren gesteuert (9). Dabei wird bFGF von den Low-affinity Rezeptoren auf der Zelloberfläche und der umgebenen ECM gebunden, konzentriert und den High-affinity Rezeptoren präsentiert, woraufhin sich die mitogene Wirkung entfaltet (9). Da sich die Low-affinity Rezeptoren vor allem in der ECM befinden, wird klar, warum SMC auf PDT-behandelter ECM besser proliferieren und bFGF auch offensichtlich besser ausschleusen können als SMC auf PL ohne jegliche Matrix in der Umgebung. Die bFGF-Konzentration in der unmittelbaren Umgebung der Zellen moduliert Zellfunktionen wie z.B. die Migration (108). Um biologisch wirksam zu werden, muss es auf der Zelloberfläche oder in unmittelbarer Umgebung der Zelle konzentriert werden (108). Da bei PDT-behandelter ECM die Heparansulfate intakt sind (87), ist dies möglich, bei Zellkulturplastik jedoch nicht. Da der genaue Mechanismus der bFGF-Ausschleusung nicht vollständig bekannt ist (1, 108), kann nur darüber spekuliert werden, warum eine erhöhte intrazelluläre bFGF Konzentration ohne eine gesteigerte Proliferation bei PDT und PL vorlag. Eine mögliche Erklärung wäre jedoch, dass die Zellen durch die Armut an Mitogenen im umgebenen Medium in einem Hungerzustand und die unter diesen Bedingungen zur Verfügung stehende Energie in Form von ATP nicht ausreichte, um den einzig bekannten, ATP-abhängigen Exozytosemechanismus für bFGF zu aktivieren (49). Für verschiedene Mitogene der ECM ist gezeigt worden, dass sie durch PDT inaktiviert werden (87, 148). Diese Mitogene stehen den SMC auf PDT behandelter ECM also zur Energiegewinnung nicht mehr zur Verfügung, wodurch die verringerte Proliferation im Vergleich zur KO-Gruppe erklärt werden kann.

Auch in den Zellen der DT-Gruppe konnte nach 24 Stunden eine signifikante Steigerung der bFGF Expression nachgewiesen werden. Warum die Zellen auf die PS-

Behandlung mit einer erhöhten bFGF-Expression reagierten ist unklar. Es ist beschrieben das Phthalocyanine bereits in Dunkelheit Nitroblau-Tetrazolin reduzieren und die Oxidation Ascorbin und Hydroquinon beschleunigen sowie die Zersetzung von Wasserstoffperoxid bewirken wobei es zur Bildung von Sauerstoffradikalen kommt (160). Diese Radikale könnten Änderungen der ECM bewirken, die zu einer gesteigerten bFGF-Expression in SMC führen. Für den Einsatz in-vivo scheinen diese Vorgänge hingegen keine bedeutende Rolle zu spielen (39, 135) Dass sowohl die Proliferation als auch der Gesamtproteingehalt der SMC durch die alleinige Behandlung der ECM mit CASPc nicht beeinflusst wurde, lässt aber darauf schließen, dass die in der ECM gespeicherten Mitogene unverändert aktiv waren. Es lässt aber auch vermuten, dass intrazelluläres bFGF für die beobachteten Effekte nach PDT keine wesentliche Rolle spielt.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt beantworten:

1. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass PDT von ECM die Proliferation von normalen, unbehandelten SMC in-vitro hemmt. Dies korrespondiert mit dem Auftreten einer dauerhaft zellfreien Media in-vivo. Dass die Proliferation der SMC nach PDT abnimmt ist für die Repopulation der Gefäßwand in-vivo günstig, scheint PDT doch die IH-verursachenden SMC zu hemmen. Dies könnte für das postinterventionelle Remodeling von entscheidender Bedeutung sein.
2. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen weiter, dass PDT von ECM die intrazelluläre bFGF Konzentration in normalen, unbehandelten SMC in-vitro beeinflusst. So reagierten SMC, die auf PDT-behandelter ECM kultiviert wurden, mit einem signifikanten Anstieg des intrazellulären bFGF-Gehalts nach 24 Stunden. Unter Berücksichtigung der deutlich erniedrigten Proliferationsrate im Vergleich zur KO-Gruppe deutet dies darauf hin, dass bFGF nicht, oder nur in wesentlich geringerem Maße als bei der KO-Gruppe aus der Zelle ausgeschleust oder außerhalb der Zelle genutzt werden konnte und eine autokrine Stimulation nur sehr begrenzt stattfand. Dass der intrazelluläre bFGF-Gehalt aber lediglich nach 24 Stunden beeinflusst wurde,



lässt aber vermuten, dass intrazelluläres bFGF für die beobachteten Proliferationsveränderungen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die PDT-induzierte Inaktivierung matrix-assoziiierter Mediatoren durch eine Modulation des Wachstums neu-einwachsender Zellen eine Hemmung von IH bewirken könnte.



## 5 Zusammenfassung

### Einleitung

Das Auftreten von Restenosen ist bei ca. 50% eine relevante Spätkomplikation bei der chirurgischen oder interventionellen Therapie von Gefäßverengungen und Gefäßverschlüssen. Intimahyperplasie (IH) und ungünstiges Gefäßremodeling (GR) stellen dabei wichtige pathogenetische Mechanismen dar, die von multiplen Faktoren beeinflusst werden. Bis heute ist es nicht gelungen, eine adäquate Therapie zur Verhinderung von Restenosen zu finden.

Innerhalb der ersten 72 Stunden nach Gefäßwandverletzung wird die Entstehung der IH maßgeblich durch das Mitogen basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) gesteuert. Photodynamische Therapie (PDT), ein Verfahren bei dem durch Lichtbestrahlung eines photosensiblen Farbstoffs Cytotoxizität und Veränderungen der extrazellulären Matrix (ECM) induziert werden, führt zur Hemmung von IH durch Inhibierung von glatten Muskelzellen (SMC) und zu einer Inaktivierung matrix-assoziierten bFGFs in-vitro. Ziel dieser Studie ist es, die Proliferation von SMC und ihre bFGF Proteinexpression nach PDT von isolierter, endothelialer ECM in-vitro zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf den Mechanismus des Remodeling nach PDT zu ziehen.

### Material und Methohen

Nach einer Standardtechnik wurde in 6-Well Zellkulturplatten endotheliale ECM hergestellt. Die ECM wurde mit dem Photosensitizer Chloraluminium sulfoniertes Phthalocyanin (CASPC) inkubiert und mit rotem Licht aus einem Diodenlaser (100 J/cm<sup>2</sup>, 100 mW/cm<sup>2</sup>,  $\lambda$ =675 nm) bestrahlt. Anschließend wurden SMC auf der ECM kultiviert. Nach 24, 48 bzw. 72 Stunden wurde die Zellproliferation durchflußzytometrisch festgestellt und die intrazelluläre Proteinexpression mit einem bFGF-ELISA bestimmt. Zum Vergleich wurde der Versuch mit unbehandelter ECM (KO), nur Laser-behandelter ECM (LO), nur CASPC-behandelter ECM sowie mit Zellkulturplatten ohne Matrix (PL) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD in Bezug zu unbehandelter ECM (KO) angegeben. Der statistische Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte mit einem univariaten ANOVA.

## **Ergebnisse**

Die Proliferation der SMC war bei PDT und PL gegenüber KO zu allen Zeitpunkten signifikant gehemmt. LO und DT zeigten keine Unterschiede im Proliferationsverhalten im Vergleich zu KO.

Die Konzentration von zell-assoziiertem bFGF war nach 24 Stunden bei PDT gegenüber KO signifikant erhöht. Nach 48 und 72 Stunden zeigte lediglich PL gegenüber KO noch eine signifikant erhöhte bFGF-Proteinexpression. Bei LO war im Vergleich zu KO kein Unterschied feststellbar, während bei DT nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der bFGF-Proteinexpression vorhanden war.

## **Schlussfolgerung**

PDT von isolierter ECM führt zu einer Proliferationshemmung von SMC in-vitro. Dass die Proliferation der SMC nach PDT abnimmt ist für die Repopulation der Gefäßwand in-vivo günstig, scheint PDT doch die IH-verursachenden SMC zu hemmen.

Die intrazelluläre bFGF-Proteinmenge ist bei PDT gegenüber KO vorübergehend erhöht. Dies könnte für eine Hemmung des Proteinausschlusses und der autokrinen Stimulation sprechen. Dass der intrazelluläre bFGF-Gehalt jedoch lediglich kurz nach PDT beeinflusst wurde, lässt vermuten, dass intrazelluläres bFGF für die anhaltende Proliferationsveränderungen der SMC nur eine untergeordnete Rolle spielt.

## 6 Summary

### Introduction

The development of restenosis is the main problem after invasive vascular interventions for the treatment of stenotic lesions. Intimal hyperplasia (IH) and unfavorable remodeling play crucial roles in the pathogenesis and are mediated by multiple factors. Up to date, there is no effective means of preventing restenosis.

In the first 72h after injury of the vascular wall basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) plays a key role for the development of IH. Photodynamic therapy (PDT), a strategy utilizing a combination of light and a photosensitive dye, causes cytotoxicity and alters the extracellular matrix (ECM). PDT prevents the formation of IH by inhibition of smooth muscle cell (SMC) proliferation, and inactivates matrix-associated bFGF in vitro. The aim of this study is to analyse SMC proliferation and bFGF expression after PDT of isolated, endothelial ECM in-vitro to draw conclusions on the mechanism underlying the remodeling after PDT.

### Materials and Methods

EC-derived ECM was prepared in 6-well plates in standardized technique. The ECM was incubated with the photosensitising dye chloroaluminum sulfonated phthalocyanine (CASPc) and illuminated with red light, emitted by a diode laser ( $\lambda=675\text{nm}$ ,  $100\text{mW}/\text{cm}^2$ ; fluence  $100\text{J}/\text{cm}^2$ ) and SMC were plated on the ECM. After 24, 48 and 72h the proliferation was quantified by means of fluorescence-labelled cell counting device and the intracellular bFGF-expression was measured with a bFGF-ELISA. Control specimens included untreated ECM (KO), ECM-free plates (PL), ECM exposed to light only (LO) and ECM exposed to CASPc only (DT). The resulting data are expressed as mean  $\pm$  SD normalized on untreated ECM (KO).

Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA.

### Results

SMC proliferation on PDT and PL was compared to KO significantly decreased at all times as compared to KO. LO and DT did not show any differences in proliferation compared with KO.

The amount of intracellular bFGF was increased on PDT after 24h. After 48h and 72h only PL showed a significantly increased bFGF-expression compared with KO. LO did

not show any differences in bFGF-expression compared to KO and only on DT after 24h the amount of intracellular bFGF was increased.

### **Conclusion**

PDT of isolated ECM inhibits the proliferation of SMC. This decreased SMC proliferation may be favourable for the repopulation of the vascular wall in-vivo, because PDT seems to inhibit SMC, the effector cells responsible for IH.

The bFGF-expression after PDT is temporarily increased. This may suggest that the secretion of bFGF and the autocrine stimulation of SMC is inhibited. Because the bFGF-expression is influenced only shortly after PDT, the intracellular bFGF-expression may not play a dominant role for the constant inhibition of the SMC proliferation.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Fiddes JC: *Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization*. Embo J, 1986. 5(10): 2523-8.
2. Adili F, Statius van Eps RG, Karp SJ, Watkins MT, LaMuraglia GM: *Differential modulation of vascular endothelial and smooth muscle cell function by photodynamic therapy of extracellular matrix: novel insights into radical-mediated prevention of intimal hyperplasia*. J Vasc Surg, 1996. 23(4): 698-705.
3. Adili F, Statius van Eps RG, LaMuraglia GM: *Significance of dosimetry in photodynamic therapy of injured arteries: classification of biological responses*. Photochem Photobiol, 1999. 70(4): 663-8.
4. Ahn SS, Concepcion B: *Indications and results of arterial stents for occlusive disease*. World J Surg, 1996. 20(6): 644-8.
5. Aktas G, Kayton R: *Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in fibroblasts and extracellular matrix*. Histochem Cell Biol, 2000. 113(3): 227-33.
6. Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H, Prats AC: *A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor*. Mol Cell Biol, 1999. 19(1): 505-14.
7. Arribas SM, Hillier C, Gonzalez C, McGrory S, Dominiczak AF, McGrath JC: *Cellular aspects of vascular remodeling in hypertension revealed by confocal microscopy*. Hypertension, 1997. 30(6): 1455-64.
8. Bai H, Masuda J, Sawa Y, Nakano S, Shirakura R, Shimazaki Y, Ogata J, Matsuda H: *Neointima formation after vascular stent implantation. Spatial and chronological distribution of smooth muscle cell proliferation and phenotypic modulation*. Arterioscler Thromb, 1994. 14(11): 1846-53.
9. Baird A: *Potential mechanisms regulating the extracellular activities of basic fibroblast growth factor (FGF-2)*. Mol Reprod Dev, 1994. 39(1): 43-8.
10. Bauters C, Meurice T, Hamon M, McFadden E, Lablanche JM, Bertrand ME: *Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice*. Cardiovasc Res, 1996. 31(6): 835-46.

11. Boulnois J: *Photophysical process in recent medical laser development: A Review*. Lasers Med Sci, 1986. 1986(1): 47-66.
12. Bown SG, Tralau CJ, Smith PD, Akdemir D, Wieman TJ: *Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in normal rat liver*. Br J Cancer, 1986. 54(1): 43-52.
13. Bradford MM: *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Anal Biochem, 1976. 72(1/2): 248-254.
14. Bugler B, Amalric F, Prats H: *Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor*. Mol Cell Biol, 1991. 11(1): 573-7.
15. Bundesamt S: *Sterblichkeit nach ausgewählten Todesursachen*. Gesundheitsbericht für Deutschland, 1998. Kapitel 3.3.
16. Calara F, Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, Kupfer J, Hedin U, Forrester J, Shah PK, Nilsson J: *Autocrine induction of DNA synthesis by mechanical injury of cultured smooth muscle cells. Potential role of FGF and PDGF*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. 16(2): 187-93.
17. Carrel A, Guthrie C: *Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney*. JAMA, 1906. 47: 1648-1650.
18. Casscells W: *Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis*. Circulation, 1992. 86(3): 723-9.
19. Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang YQ, Nabel GJ, Nabel EG, Parmacek MS, Leiden JM: *Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product*. Science, 1995. 267(5197): 518-22.
20. Chervu A, Moore WS: *An overview of intimal hyperplasia*. Surg Gynecol Obstet, 1990. 171(5): 433-47.
21. Clowes AW, Clowes MM: *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. II. Inhibition of smooth muscle growth by heparin*. Lab Invest, 1985. 52(6): 611-6.
22. Clowes AW, Clowes MM, Au YP, Reidy MA, Belin D: *Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery*. Circ Res, 1990. 67(1): 61-7.

23. Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA: *Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery*. J Cardiovasc Pharmacol, 1989. 14 Suppl 6: S12-15.
24. Clowes AW, Clowes MM, Kocher O, Ropraz P, Chaponnier C, Gabbiani G: *Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin*. J Cell Biol, 1988. 107(5): 1939-45.
25. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM: *Mechanisms of stenosis after arterial injury*. Lab Invest, 1983. 49(2): 208-15.
26. Clowes AW, Schwartz SM: *Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery*. Circ Res, 1985. 56(1): 139-45.
27. Coats WD, Jr., Faxon DP: *The role of the extracellular matrix in arterial remodelling*. Semin Interv Cardiol, 1997. 2(3): 167-76.
28. Connolly DT, Stoddard BL, Harakas NK, Feder J: *Human fibroblast-derived growth factor is a mitogen and chemoattractant for endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. 144(2): 705-12.
29. Cordon-Cardo C, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z: *Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues*. Lab Invest, 1990. 63(6): 832-40.
30. Curzen NP, Fox KM: *Do ACE inhibitors modulate atherosclerosis?* Eur Heart J, 1997. 18(10): 1530-5.
31. Dartsch PC, Ischinger T, Betz E: *Responses of cultured smooth muscle cells from human nonatherosclerotic arteries and primary stenosing lesions after photoradiation: implications for photodynamic therapy of vascular stenoses*. J Am Coll Cardiol, 1990. 15(7): 1545-50.
32. Davies MG, Hagen PO: *Pathobiology of intimal hyperplasia*. Br J Surg, 1994. 81(9): 1254-69.
33. de Kossodo S, Cruz PD, Jr., Dougherty I, Thompson P, Silva-Valdez M, Beutler B: *Expression of the tumor necrosis factor gene by dermal fibroblasts in response to ultraviolet irradiation or lipopolysaccharide*. J Invest Dermatol, 1995. 104(3): 318-22.
34. De Scheerder I, Wang K, Nikolaychik V, Kaul U, Singh B, Sahota H, Keelan MH, Kipshidze N: *Long-term follow-up after coronary stenting and intravascular red laser therapy*. Am J Cardiol, 2000. 86(9): 927-30.



35. De Scheerder IK, Wang K, Kaul U, Singh B, Sahota H, Keelan MH, Kipshidze NN, Moses J: *Intravascular low-power laser irradiation after coronary stenting: long-term follow-up*. Lasers Surg Med, 2001. 28(3): 212-5.
36. Delrieu I: *The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism*. FEBS Lett, 2000. 468(1): 6-10.
37. DeYoung MB, Dichek DA: *Gene therapy for restenosis: are we ready?* Circ Res, 1998. 82(3): 306-13.
38. Douek PC, Correa R, Neville R, Unger EF, Shou M, Banai S, Ferrans VJ, Epstein SE, Leon MB, Bonner RF: *Dose-dependent smooth muscle cell proliferation induced by thermal injury with pulsed infrared lasers*. Circulation, 1992. 86(4): 1249-56.
39. Dummin H, Cernay T, Zimmermann HW: *Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn (II) phthalocyanines with lipophilic side-chains*. J Photochem Photobiol B, 1997. 37(3): 219-29.
40. Dzau VJ, Gibbons GH: *Vascular remodeling: mechanisms and implications*. J Cardiovasc Pharmacol, 1993. 21 Suppl 1: S1-5.
41. Emanuelsson H, Beatt KJ, Bagger JP, Balcon R, Heikkila J, Piessens J, Schaeffer M, Suryapranata H, Foegh M: *Long-term effects of angiopeptin treatment in coronary angioplasty. Reduction of clinical events but not angiographic restenosis. European Angiopeptin Study Group*. Circulation, 1995. 91(6): 1689-96.
42. Engleka KA, Maciag T: *Inactivation of human fibroblast growth factor-1 (FGF-1) activity by interaction with copper ions involves FGF-1 dimer formation induced by copper-catalyzed oxidation*. J Biol Chem, 1992. 267(16): 11307-15.
43. Eton D, Shim V, Maibenco TA, Spero K, Cava RA, Borhani M, Grossweiner L, Ahn SS: *Cytotoxic effect of photodynamic therapy with Photofrin II on intimal hyperplasia*. Ann Vasc Surg, 1996. 10(3): 273-82.
44. Faxon DP: *Effect of high dose angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis: final results of the MARCATOR Study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of cilazapril. The Multicenter American Research Trial With Cilazapril After Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MARCATOR) Study Group*. J Am Coll Cardiol, 1995. 25(2): 362-9.

45. Field SL, Khachigian LM, Sleigh MJ, Yang G, Vandermark SE, Hogg PJ, Chesterman CN: *Extracellular matrix is a source of mitogenically active platelet-derived growth factor*. J Cell Physiol, 1996. 168(2): 322-32.
46. Fingar VH, Henderson BW: *Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: a study of tumor and normal tissue response*. Photochem Photobiol, 1987. 46(5): 837-41.
47. Fingerle J, Au YP, Clowes AW, Reidy MA: *Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury*. Arteriosclerosis, 1990. 10(6): 1082-7.
48. Fisher AM, Murphree AL, Gomer CJ: *Clinical and preclinical photodynamic therapy*. Lasers Surg Med, 1995. 17(1): 2-31.
49. Florkiewicz RZ, Majack RA, Buechler RD, Florkiewicz E: *Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway*. J Cell Physiol, 1995. 162(3): 388-99.
50. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I: *A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane*. Am J Pathol, 1988. 130(2): 393-400.
51. Foote CS, Shook FC, Abakerli RB: *Characterization of singlet oxygen*. Methods Enzymol, 1984. 105: 36-47.
52. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J: *A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies*. J Am Coll Cardiol, 1991. 17(3): 758-69.
53. Fridman R, Alon Y, Doljanski F, Fuks Z, Vlodavsky I: *Cell interaction with the extracellular matrices produced by endothelial cells and fibroblasts*. Exp Cell Res, 1985. 158(2): 461-76.
54. Fuster V, Falk E, Fallon JT, Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ: *The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate*. Thromb Haemost, 1995. 74(1): 552-9.
55. Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA: *Fibroblast growth factors and their receptors*. Biochem Cell Biol, 1997. 75(6): 669-85.
56. Geary RL, Nikkari ST, Wagner WD, Williams JK, Adams MR, Dean RH: *Wound healing: a paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction*. J Vasc Surg, 1998. 27(1): 96-106; discussion 106-8.

57. Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L: *Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis*. Crit Rev Oncol Hematol, 2000. 34(3): 185-94.
58. Gibbons GH, Dzau VJ: *The emerging concept of vascular remodeling*. N Engl J Med, 1994. 330(20): 1431-8.
59. Girotti AW: *Photodynamic lipid peroxidation in biological systems*. Photochem Photobiol, 1990. 51(4): 497-509.
60. Gospodarowicz D, Ferrara N, Haaparanta T, Neufeld G: *Basic fibroblast growth factor: expression in cultured bovine vascular smooth muscle cells*. Eur J Cell Biol, 1988. 46(1): 144-51.
61. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L: *Fibroblast growth factor*. Mol Cell Endocrinol, 1986. 46(3): 187-204.
62. Gospodarowicz D, Vlodavsky I, Savion N: *The extracellular matrix and the control of proliferation of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells*. J Supramol Struct, 1980. 13(3): 339-72.
63. Grant WE, Buonaccorsi G, Speight PM, MacRobert AJ, Hopper C, Bown SG: *The effect of photodynamic therapy on the mechanical integrity of normal rabbit carotid arteries*. Laryngoscope, 1995. 105(8 Pt 1): 867-71.
64. Grondin CM, Meere C, Castonguay Y, Lepage G, Grondin P: *Progressive and late obstruction of an aorto-coronary venous bypass graft*. Circulation, 1971. 43(5): 698-702.
65. Groves HM, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Moore S, Mustard JF: *Platelet interaction with damaged rabbit aorta*. Lab Invest, 1979. 40(2): 194-200.
66. Grunwald J, Haudenschild CC: *Intimal injury in vivo activates vascular smooth muscle cell migration and explant outgrowth in vitro*. Arteriosclerosis, 1984. 4(3): 183-8.
67. Hadoke PW, Wadsworth RM, Wainwright CL, Butler KD, Giddings MJ: *Subcutaneous infusion of r-hirudin does not inhibit neointimal proliferation after angioplasty of the subclavian artery in cholesterol-fed rabbits*. Coron Artery Dis, 1996. 7(8): 599-608.
68. Hahn AW, Resink TJ, Bernhardt J, Ferracin F, Buhler FR: *Stimulation of autocrine platelet--derived growth factor AA-homodimer and transforming*

- growth factor beta in vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. 178(3): 1451-8.
69. Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch KR: *Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty*. Circ Res, 1990. 67(3): 651-9.
70. Heckenkamp J, Leszczynski D, Schiereck J, Kung J, LaMuraglia GM: *Different effects of photodynamic therapy and gamma-irradiation on vascular smooth muscle cells and matrix : implications for inhibiting restenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. 19(9): 2154-61.
71. Heimark RL, Twardzik DR, Schwartz SM: *Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets*. Science, 1986. 233(4768): 1078-80.
72. Henderson BW, Dougherty TJ: *How does photodynamic therapy work?* Photochem Photobiol, 1992. 55(1): 145-57.
73. Hetts SW: *To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease*. Jama, 1998. 279(4): 300-7.
74. Hsiang Y, Houston G, Crespo T, To E, Todd M, Sobeh M, Bower R: *Preventing intimal hyperplasia with photodynamic therapy using an intravascular probe*. Ann Vasc Surg, 1995. 9(1): 80-6.
75. Indolfi C, Esposito G, Di Lorenzo E, Rapacciuolo A, Feliciello A, Porcellini A, Avvedimento VE, Condorelli M, Chiariello M: *Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty*. Circulation, 1995. 92(5): 1230-5.
76. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH: *Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation*. J Am Coll Cardiol, 1990. 15(7): 1667-87.
77. Jenkins MP, Buonaccorsi GA, Mansfield R, Bishop CC, Bown SG, McEwan JR: *Reduction in the response to coronary and iliac artery injury with photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid*. Cardiovasc Res, 2000. 45(2): 478-85.
78. Jenkins MP, Buonaccorsi GA, Raphael M, Nyamekye I, McEwan JR, Bown SG, Bishop CC: *Clinical study of adjuvant photodynamic therapy to reduce restenosis following femoral angioplasty*. Br J Surg, 1999. 86(10): 1258-63.
79. Kagan SA, Myers SI: *Mediators of restenosis*. Surg Clin North Am, 1998. 78(3): 481-500.

80. Karu T: *Photobiology of low-power laser effects*. Health Phys, 1989. 56(5): 691-704.
81. Kelly JL, Sanchez A, Brown GS, Chesterman CN, Sleigh MJ: *Accumulation of PDGF B and cell-binding forms of PDGF A in the extracellular matrix*. J Cell Biol, 1993. 121(5): 1153-63.
82. Kimel S, Tromberg BJ, Roberts WG, Berns MW: *Singlet oxygen generation of porphyrins, chlorins, and phthalocyanines*. Photochem Photobiol, 1989. 50(2): 175-83.
83. Kimura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Tamura T, Kaburagi S, Sawada Y, Sato Y, Hamasaki N, Nosaka H, et al.: *Three-year follow-up after implantation of metallic coronary-artery stents*. N Engl J Med, 1996. 334(9): 561-6.
84. Korner G, Bjornsson TD, Vlodavsky I: *Extracellular matrix produced by cultured corneal and aortic endothelial cells contains active tissue-type and urokinase-type plasminogen activators*. J Cell Physiol, 1993. 154(3): 456-65.
85. Koshida K, Hisazumi H, Komatsu K, Hirata A, Uchibayashi T: *Possible advantages of aluminum-chloro-tetrasulfonated phthalocyanine over hematoporphyrin derivative as a photosensitizer in photodynamic therapy*. Urol Res, 1993. 21(4): 283-8.
86. Koyama N, Harada K, Yamamoto A, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S: *Purification and characterization of an autocrine migration factor for vascular smooth muscle cells (SMC), SMC-derived migration factor*. J Biol Chem, 1993. 268(18): 13301-8.
87. LaMuraglia G, Farzin Adili MSJK, MD; Randolph G. Statius van Eps, MD and Michael T. Watkins, MD: *Photodynamic therapy inactivates extracellular matrix-basic fibroblast growth factor: Insights to its effect on the vascular wall*. J Vasc Surg, 1997. 1997;26: 294-301.
88. LaMuraglia GM, Chandrasekar N, Flotte T, Abbott W, Michaud N, Hasan T: *Photodynamic therapy inhibition of experimental intimal hyperplasia: Acute and chronic effects*. J Vasc Surg, 1994. 19: 321-331.
89. LaMuraglia GM, Ortu P, Flotte TJ, Roberts WG, Schomacker KT, ChandraSekar NR, Hasan T: *Chloroaluminum sulfonated phthalocyanine partitioning in normal and intimal hyperplastic artery in the rat. Implications for photodynamic therapy*. Am J Pathol, 1993. 142(6): 1898-905.

90. LaMuraglia GM, Schiereck J, Heckenkamp J, Nigri G, Waterman P, Leszczynski D, Kossodo S: *Photodynamic therapy induces apoptosis in intimal hyperplastic arteries*. Am J Pathol, 2000. 157(3): 867-75.
91. Landau C, Lange RA, Hillis LD: *Percutaneous transluminal coronary angioplasty*. N Engl J Med, 1994. 330(14): 981-93.
92. Langille BL: *Arterial remodeling: relation to hemodynamics*. Can J Physiol Pharmacol, 1996. 74(7): 834-41.
93. Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, Wong SC, Fish D, Ellis S, Holmes DR, Kerieakes D, Kuntz RE: *Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting*. N Engl J Med, 2001. 344(4): 250-6.
94. Lesperance J, Bourassa MG, Schwartz L, Hudon G, Laurier J, Eastwood C, Kazim F: *Definition and measurement of restenosis after successful coronary angioplasty: implications for clinical trials*. Am Heart J, 1993. 125(5 Pt 1): 1394-408.
95. Li Z, Moore S, Alavi MZ: *Mitogenic factors released from smooth muscle cells are responsible for neointimal cell proliferation after balloon catheter deendothelialization*. Exp Mol Pathol, 1995. 63(2): 77-86.
96. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK: *A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression*. Circulation, 1992. 86(6 Suppl): III47-52.
97. Lindner V: *Role of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor (B-chain) in neointima formation after arterial injury*. Z Kardiol, 1995. 84(Suppl 4): 137-44.
98. Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA: *Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation*. Circ Res, 1991. 68(1): 106-13.
99. Lindner V, Majack RA, Reidy MA: *Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries*. J Clin Invest, 1990. 85(6): 2004-8.
100. Lindner V, Reidy MA: *Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by smooth muscle cells and endothelium in injured rat arteries. An en face study*. Circ Res, 1993. 73(3): 589-95.



101. Lindner V, Reidy MA: *Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(9): 3739-43.
102. Lipton SA, Kater SB: *Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival*. Trends Neurosci, 1989. 12(7): 265-70.
103. Litvack F, Grundfest WS, Forrester JS, Fishbein MC, Swan HJ, Corday E, Rider DM, McDermid IS, Pacala TJ, Laudenslager JB: *Effects of hematoporphyrin derivative and photodynamic therapy on atherosclerotic rabbits*. Am J Cardiol, 1985. 56(10): 667-71.
104. Manninen HI, Makinen K: *Gene therapy techniques for peripheral arterial disease*. Cardiovasc Intervent Radiol, 2002. 25(2): 98-108.
105. Martyre MC, Le Bousse-Kerdiles MC, Romquin N, Chevillard S, Praloran V, Demory JL, Dupriez B: *Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis*. Br J Haematol, 1997. 97(2): 441-8.
106. McBride W, Lange RA, Hillis LD: *Restenosis after successful coronary angioplasty. Pathophysiology and prevention*. N Engl J Med, 1988. 318(26): 1734-7.
107. Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB: *Basic fibroblast growth factor released by single, isolated cells stimulates their migration in an autocrine manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(24): 11007-11.
108. Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB: *Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex*. J Cell Physiol, 1992. 151(1): 81-93.
109. Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Popma JJ, Satler LF, Leon MB: *Intravascular ultrasound insights into mechanisms of stenosis formation and restenosis*. Cardiol Clin, 1997. 15(1): 17-29.
110. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, Hong MK, Kovach JA, Leon MB: *Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study*. Circulation, 1996. 94(1): 35-43.
111. Moan J, Berg K, Kvam E, Western A, Malik Z, Ruck A, Schneckenburger H: *Intracellular localization of photosensitizers*. Ciba Found Symp, 1989. 146: 95-107; discussion 107-11.



112. Mondy JS, Williams JK, Adams MR, Dean RH, Geary RL: *Structural determinants of lumen narrowing after angioplasty in atherosclerotic nonhuman primates*. J Vasc Surg, 1997. 26(5): 875-83.
113. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ: *Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(18): 8474-8.
114. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ: *Colchicine and antineoplastic therapy for the prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions*. J Am Coll Cardiol, 1991. 17(6 Suppl B): 126B-131B.
115. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, Maciag T, Nabel GJ: *Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo*. Nature, 1993. 362(6423): 844-6.
116. Nagae T, Aizawa K, Uchimura N, Tani D, Abe M, Fujishima K, Wilson SE, Ishimaru S: *Endovascular photodynamic therapy using mono-L-aspartyl-chlorin e6 to inhibit Intimal hyperplasia in balloon-injured rabbit arteries*. Lasers Surg Med, 2001. 28(4): 381-8.
117. Neave V, Giannotta S, Hyman S, Schneider J: *Hematoporphyrin uptake in atherosclerotic plaques: therapeutic potentials*. Neurosurgery, 1988. 23(3): 307-12.
118. Nguyen HC, Steinberg BM, LeBoutillier M, 3rd, Baumann FG, Rifkin DB, Grossi EA, Galloway AC: *Suppression of neointimal lesions after vascular injury: a role for polyclonal anti-basic fibroblast growth factor antibody*. Surgery, 1994. 116(2): 456-61; discussion 461-2.
119. Nikol S, Huehns TY: *Preclinical and clinical experience in vascular gene therapy: advantages over conservative/standard therapy*. J Invasive Cardiol, 2001. 13(4): 333-8.
120. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N: *Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1492(1): 203-6.
121. Nyamekye I, Anglin S, McEwan J, MacRobert A, Bown S, Bishop C: *Photodynamic therapy of normal and balloon-injured rat carotid arteries using 5-amino-levulinic acid*. Circulation, 1995. 91(2): 417-25.

122. Oleinick NL, Evans HH: *The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms*. Radiat Res, 1998. 150(5 Suppl): S146-56.
123. Ortu P, LaMuraglia GM, Roberts WG, Flotte TJ, Hasan T: *Photodynamic therapy of arteries. A novel approach for treatment of experimental intimal hyperplasia*. Circulation, 1992. 85(3): 1189-96.
124. Overhaus M, Heckenkamp J, Kossodo S, Leszczynski D, LaMuraglia GM: *Photodynamic therapy generates a matrix barrier to invasive vascular cell migration*. Circ Res, 2000. 86(3): 334-40.
125. Patterson MS, Madsen SJ, Wilson BC: *Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring in vivo during photodynamic therapy*. J Photochem Photobiol B, 1990. 5(1): 69-84.
126. Pokrajac B, Potter R, Maca T, Fellner C, Mittlbock M, Ahmadi R, Seitz W, Minar E: *Intraarterial (192)Ir high-dose-rate brachytherapy for prophylaxis of restenosis after femoropopliteal percutaneous transluminal angioplasty: the prospective randomized Vienna-2-trial radiotherapy parameters and risk factors analysis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. 48(4): 923-31.
127. Pollard HB, Menard R, Brandt HA, Pazoles CJ, Creutz CE, Ramu A: *Application of Bradford's protein assay to adrenal gland subcellular fractions*. Anal Biochem, 1978. 86(2): 761-3.
128. Preisack MB, Baildon R, Eschenfelder V, Foley D, Garcia E, Kaltenbach M, Meisner C, Selbmann HK, Serruys PW, Shiu MF, Sujatta M, Bonan R, Karsch KR: *[Low molecular weight heparin, reviparin, after PTCA: results of a randomized double-blind, standard heparin and placebo controlled multicenter study (REDUCE Study)]*. Z Kardiol, 1997. 86(8): 581-91.
129. Randone B, Cucina A, Graziano P, Corvino V, Cavallaro G, Palmieri I, Cavallaro A, Sterpetti AV: *Suppression of smooth muscle cell proliferation after experimental PTFE arterial grafting: a role for polyclonal anti-basic fibroblast growth factor (bFGF) antibody*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1998. 16(5): 401-7.
130. Reidy MA: *A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation*. Lab Invest, 1985. 53(5): 513-20.
131. Reidy MA, Fingerle J, Lindner V: *Factors controlling the development of arterial lesions after injury*. Circulation, 1992. 86(6 Suppl): III43-6.

132. Roberts WG, Klein MK, Loomis M, Weldy S, Berns MW: *Photodynamic therapy of spontaneous cancers in felines, canines, and snakes with chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine*. J Natl Cancer Inst, 1991. 83(1): 18-23.
133. Rockson SG, Kramer P, Razavi M, Szuba A, Filardo S, Fitzgerald P, Cooke JP, Yousuf S, DeVault AR, Renschler MF, Adelman DC: *Photoangioplasty for human peripheral atherosclerosis: results of a phase I trial of photodynamic therapy with motexafin lutetium (Antrin)*. Circulation, 2000. 102(19): 2322-4.
134. Rogelj S, Klagsbrun M, Atzmon R, Kurokawa M, Haimovitz A, Fuks Z, Vlodavsky I: *Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells*. J Cell Biol, 1989. 109(2): 823-31.
135. Rosenthal I: *Phthalocyanines as photodynamic sensitizers*. Photochem Photobiol, 1991. 53(6): 859-70.
136. Sarembock IJ, Gertz SD, Gimple LW, Owen RM, Powers ER, Roberts WC: *Effectiveness of recombinant desulphatohirudin in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits*. Circulation, 1991. 84(1): 232-43.
137. Savage MP, Douglas JS, Jr., Fischman DL, Pepine CJ, King SB, 3rd, Werner JA, Bailey SR, Overlie PA, Fenton SH, Brinker JA, Leon MB, Goldberg S: *Stent placement compared with balloon angioplasty for obstructed coronary bypass grafts. Saphenous Vein De Novo Trial Investigators*. N Engl J Med, 1997. 337(11): 740-7.
138. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, Nissen SE, Tuzcu EM: *Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of "dilated" versus "obstructive" coronary atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2001. 38(2): 297-306.
139. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR, Jr.: *Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards*. J Am Coll Cardiol, 1998. 32(7): 2087-94.
140. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER: *The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis*. Circ Res, 1995. 77(3): 445-65.
141. Sessler JL, Miller RA: *Texaphyrins: new drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy*. Biochem Pharmacol, 2000. 59(7): 733-9.

142. Shi Y, O'Brien JE, Jr., Ala-Kokko L, Chung W, Mannion JD, Zalewski A: *Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair*. *Circulation*, 1997. 95(4): 997-1006.
143. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesse D, Gabbiani G: *A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation*. *J Cell Biol*, 1986. 103(6 Pt 2): 2787-96.
144. Sorensen J, Phelps M: *Philadelphia: WB Saunders Co*. *Physics in Nuclear Medicine*, 1987: 15-29.
145. Spears JR, Serur J, Shropshire D, Paulin S: *Fluorescence of experimental atheromatous plaques with hematoporphyrin derivative*. *J Clin Invest*, 1983. 71(2): 395-9.
146. Spikes JD: *Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors*. *Photochem Photobiol*, 1986. 43(6): 691-9.
147. Statius van Eps RG, Adili F, LaMuraglia GM: *Photodynamic therapy inactivates cell-associated basic fibroblast growth factor: a silent way of vascular smooth muscle cell eradication*. *Cardiovasc Res*, 1997. 35(2): 334-40.
148. Statius van Eps RG, Adili F, Watkins MT, Anderson RR, LaMuraglia GM: *Photodynamic therapy of extracellular matrix stimulates endothelial cell growth by inactivation of matrix-associated transforming growth factor-beta*. *Lab Invest*, 1997. 76(2): 257-66.
149. Statius van Eps RG, ChandraSekar NR, Hasan T, LaMuraglia GM: *Importance of the treatment field for the application of vascular photodynamic therapy to inhibit intimal hyperplasia*. *Photochem Photobiol*, 1998. 67(3): 337-42.
150. Statius van Eps RG, LaMuraglia GM: *Photodynamic therapy inhibits transforming growth factor beta activity associated with vascular smooth muscle cell injury*. *J Vasc Surg*, 1997. 25(6): 1044-52; discussion 1052-3.
151. Statius van Eps RG, Mark LL, Schiereck J, LaMuraglia GM: *Photodynamic therapy inhibits the injury-induced fibrotic response of vascular smooth muscle cells*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1999. 18(5): 417-23.
152. Stouffer GA, Runge MS: *The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells*. *Semin Thromb Hemost*, 1998. 24(2): 145-50.
153. Taubman MB, Rollins BJ, Poon M, Marmur J, Green RS, Berk BC, Nadal-Ginard B: *JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived*

- growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells.* Circ Res, 1992. 70(2): 314-25.
154. Taylor LM, Jr., Edwards JM, Porter JM: *Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series.* J Vasc Surg, 1990. 11(2): 193-205; discussion 205-6.
155. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P: *Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting.* N Engl J Med, 1997. 336(24): 1697-703.
156. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA: *Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells.* Arteriosclerosis, 1990. 10(6): 966-90.
157. Trauner KB, Gandour-Edwards R, Bamberg M, Shortkroff S, Sledge C, Hasan T: *Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis.* Photochem Photobiol, 1998. 67(1): 133-9.
158. van Leeuwen WM, Deckers P, de Lange WJ: *Preoperative irradiation for prophylaxis of ectopic ossification after hip arthroplasty. A randomized study in 62 hips.* Acta Orthop Scand, 1998. 69(2): 116-8.
159. Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M: *Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(8): 2292-6.
160. Vol'pin ME, Novodarova GN, Krainova N, Lapikova VP, Aver'yanov AA: *Redox and fungicidal properties of phthalocyanine metal complexes as related to active oxygen.* J Inorg Biochem, 2000. 81(4): 285-92.
161. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR: *Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein.* J Cell Biol, 1984. 99(6): 2034-40.
162. Waksman R: *Vascular brachytherapy: from investigation to approval.* Cardiovasc Radiat Med, 2001. 2(2): 61-2.
163. Waller BF, Orr CM, VanTassel J, Peters T, Fry E, Hermiller J, Grider LD: *Coronary artery and saphenous vein graft remodeling: a review of histologic*

- findings after various interventional procedures--Part II.* Clin Cardiol, 1996. 19(10): 817-23.
164. Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, Kosinski AS, King SB, 3rd, Ivanhoe R, Cedarholm JC, Stillabower ME, Talley JD, DeMaio SJ, et al.: *Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. Lovastatin Restenosis Trial Study Group.* N Engl J Med, 1994. 331(20): 1331-7.
165. Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, Valeri CR, Ryan TJ, Faxon DP: *Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury.* Circulation, 1987. 75(3): 636-42.
166. Winkles JA, Friesel R, Burgess WH, Howk R, Mehlman T, Weinstein R, Maciag T: *Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding growth factor I (endothelial cell growth factor).* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(20): 7124-8.
167. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E: *Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model.* J Clin Invest, 1994. 93(3): 1172-8.
168. Wolfe JH, Tyrrell MR: *Justifying arterial reconstruction to crural vessels--even with a prosthetic graft.* Br J Surg, 1991. 78(8): 897-9.
169. Young L, Bilsland J, Harper S: *A rapid method for determination of cell survival in primary neuronal DRG cultures.* J Neurosci Methods, 1999. 93(1): 81-9.
170. Yu ZX, Biro S, Fu YM, Sanchez J, Smale G, Sasse J, Ferrans VJ, Casscells W: *Localization of basic fibroblast growth factor in bovine endothelial cells: immunohistochemical and biochemical studies.* Exp Cell Res, 1993. 204(2): 247-59.

## Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Th. Schmitz-Rixen danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Weiter danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. med. F. Adili für seine gute Betreuung, seine hilfreichen Anregungen sowie für seine Unterstützung bis zum endgültigem Abschluss der Arbeit.

Einen besonderer Dank auch an Herrn Dr. St. Barth und Herrn Dr. M. Huhn für die Unterstützung bei den Proteinanalysen sowie Frau I. Karalus für Anleitung und tatkräftige Hilfe bei den Zellkulturarbeiten.

Nicht zuletzt danke ich Till Scholz für die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit. Ohne sie wäre die Arbeit nicht realisiert worden.



## Sebastian Gathmann

<b>Persönliche</b>	Adresse	Weingartenweg 1, CH 3930 Visp
<b>Daten</b>	Familienstand	ledig
	Staatsangehörigkeit	deutsch
	Konfession	katholisch
	Geburtsdatum	8. Mai 1974
	Geburtsort	Bad Berleburg
	Eltern	Meinolf Gathmann, Oberstudiendirektor iR. Gisela Gathmann, Hausfrau
<b>Schulbildung</b>	1980 - 1984	Grundschule Bad Laasphe
	1984 - 1993	Städt. Gymnasium Bad Laasphe
	1993	Allgemeine Hochschulreife
<b>Ersatzdienst</b>	Juli 1993 – Oktober 1994	Ostseeklinik Damp, Akutstation und Rehabilitation
<b>Hochschulstudium</b>	seit Oktober 1994	Studium der Humanmedizin, Universität Köln
	August 1996	Ärztliche Vorprüfung
	August 1997	1. Staatsexamen
	September 2000	2. Staatsexamen
	Dezember 2001	3. Staatsexamen
<b>Praktisches Jahr</b>	ab Oktober 2000	Chirurgie, Regionalspital Visp, Schweiz
	ab Februar 2001	Orthopädie, Univ. Stellenbosch, Südafrika
	ab Juni 2001	Innere Medizin, Kliniken Merheim, Köln
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	Januar 2002 bis September 2002	Arzt im Praktikum, Orthopädische Klinik, Johanna-Etienne-Krankenhaus, Neuss
	seit September 2002	Assistenzarzt, Chirurgische Klinik, Visp, Schweiz

S. Gathmann

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Hemmung der durch basic Fibroblast Growth Factor vermittelten autokrinen Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen nach photodynamischer Therapie von isolierter Extrazellulärmatrix“

in dem


Zentrum der Chirurgie Schwerpunkt Gefäß- und Endovascularchirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main und in Kollaboration mit der Medizinischen Klinik I der Universität zu Köln

unter der Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Th. Schmitz-Rixen

mit Unterstützung durch Priv. Doz. Dr. med. F. Adili, Dr. St. Barth, Dr. M. Huhn und Frau I. Karalus ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt, 11. Juni 2003

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Gallmann'. The signature is written in a cursive, flowing style with a large initial 'S'.